

09626026

44 ch 42

4

A1

DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION

(21)

N° 77 06140

RECEIVED

DEC 29 2001

TECH CENTER 1600/2900

(54) Médicaments antimicrobiens et procédé de leur préparation.

(51) Classification internationale (Int. Cl.³). A 61 K 45/08.

(22) Date de dépôt 2 mars 1977, à 16 h 14 mn.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : *Demande de brevet déposée aux Etats-Unis d'Amérique le
2 mars 1976, n. 663.046 aux noms de Lowell P. Hager, Daniel R. Storm, John A.
Katzenellenbogen, Joseph T. Wachsman et Richard I. Gumpert.*(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande B.O.P.I. — «Listes» n. 39 du 30-9-1977.

(71) Déposant : Société dite : PHARMACO, INC., résidant aux Etats-Unis d'Amérique.

(72) Invention de :

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Plasseraud.

La présente invention concerne des médicaments antimicrobiens et plus particulièrement des compositions antimicrobiennes constituées de composés antimicrobiens unis par covalence à des supports polymères de taille relativement importante et un procédé
5 de leur préparation.

Beaucoup de composés antimicrobiens pourraient être utilisés en thérapeutique humaine ou animale s'ils ne devenaient pas toxiques lorsqu'ils sont absorbés par la peau, les muqueuses ou les voies gastro-intestinales. Par exemple on utilisait couram-
10 ment jusqu'à ces derniers temps l'hexachlorophène comme désinfectant et antimicrobien dans les savons et détergents. Cependant on n'emploie plus de façon habituelle l'hexachlorophène, car il peut être absorbé par la peau et présenter une toxicité neurologique. Dans le même ordre d'idées, des programmes de recherches pharmaceutiques ont conduit à l'isolement et à la caractérisation d'un
15 grand nombre de produits naturels ayant une activité antimicrobienne, mais qu'on ne peut utiliser en raison de leurs effets toxiques. Pour réduire au minimum l'absorption et localiser l'agent antimicrobien, on applique fréquemment les antibiotiques par
20 voie locale dans des pommades immobilisantes. Par exemple, le "Neosporin" renferme de la bacitracine, de la polymyxine et de la néomycine dans une base pour pommades. Ces trois antibiotiques sont rarement utilisés par voie interne en raison des effets toxiques secondaires de leur emploi. Dans le cas du "Neosporin", la
25 pommade sert essentiellement à localiser la zone de traitement. Cependant on connaît de nombreux agents antimicrobiens que l'on ne peut appliquer même dans une base pour pommades à des zones locales car ils seraient absorbés et toxiques. Le chloramphénicol et la novobiocine sont des agents antimicrobiens extrêmement toxiques
30 qui sont rapidement absorbés par les voies gastro-intestinales. Leur emploi n'est recommandé que dans les infections que l'on ne peut traiter de façon efficace avec des agents moins toxiques.

Dans certains domaines, on a tenté d'unir de façon permanente de petites molécules à des molécules supports polymères
35 bien plus importantes qui, en raison de leur taille, empêchent le passage des petits agents chimiques à travers la surface de la peau ou des muqueuses.

Cette technique d'immobilisation moléculaire a été appliquée aux additifs alimentaires et on trouvera une étude de cette
40

application particulière dans les numéros de janvier et juin 1974 de Food Engineering; dans The Manufacturing Confectioner, Volume 54, n°2, février 1974; et dans un article du 18 juin 1973 de Wall Street Journal. Il semble que les colorants alimentaires, les
5 anti-oxydants et d'autres additifs, lorsqu'on les unit chimiquement à des molécules de polymère, traversent les voies intestinales sans être absorbés.

Bien qu'on colorant ou un anti-oxydant alimentaires, lorsqu'ils sont immobilisés par fixation chimique à une molécule support polymère, puissent conserver leur couleur ou leurs propriétés d'inhibition de l'oxydation avant l'ingestion, on ne peut
10 s'attendre à ce qu'un agent pharmaceutique tel qu'un agent antimicrobien conserve son activité lorsqu'on l'a ainsi immobilisé. De plus, alors que les colorants et les anti-oxydants jouent leur
15 rôle dans l'aliment avant l'ingestion, en améliorant l'aspect ou en conservant la saveur, il est inutile que ces agents chimiques conservent leurs propriétés désirées après ingestion. Au contraire, un agent antimicrobien doit conserver son activité biologique vis-à-vis des microbes dans tous les environnements d'utilisation.
20 De plus, des raisons pratiques permettent de penser que lorsque ces agents pharmaceutiques sont fixés de façon permanente à des molécules supports polymères par des liaisons chimiques stables, ils perdent leur activité biologique.

Par exemple on a formé des dérivés de fibres cellulosiques
25 et de cations antibactériens ou de restes organomercuriels ou organostanniques. On a indiqué que ces fibres traitées présentaient une activité antibiotique à condition que les molécules actives soient libérées par dégradation de leurs liaisons chimiques avec les fibres supports; lorsqu'on utilise des liaisons totalement
30 stables, les fibres traitées n'ont pas d'activité antibiotique. (Z.A. Rogovin et A.D. Virnik dans "High polymers", (N.M. Bikales et L.Segal, eds.) Volume V, Partie V, Wiley-Interscience, 1971, pp. 1333-1336).

De nombreux brevets décrivent l'immobilisation temporaire
35 d'agents pharmaceutiques actifs par adsorption ou dispersion dans des huiles ou la pectine (brevets de H.Welch. U.S. n° 2 491 537, n° 2 518 510, et de B.S. Whittingham U.S. n° 2 481 805 et n° 2 481 804), par liaisons ioniques à des acides ou des bases polymères (brevets P.C. Wirth U.S. n° 3 832 340 et L.Loewe U.S. n°
40 2 656 298) ou par des liaisons chimiques instables (brevet C.F.

Collins et L.J. Dahe U.S. n° 3 320 236. Ces préparations modifient la durée d'action de l'agent médicamenteux en provoquant sa libération lente, mais il est évident que seul l'agent médicamenteux libre, après libération du complexe, est actif et non
5 l'agent médicamenteux immobilisé lui-même.

On ne connaît donc pas de procédé pour résoudre le problème de l'obtention d'un agent antimicrobien immobilisé de façon permanente par liaison stable à une molécule support polymère, mais conservant l'activité correspondant à l'utilisation d'origine,
10 ne, quelle que soit cette utilisation.

Bien que l'obstacle principal qui est vaincu par l'invention soit la nécessité de conserver l'activité biologique des agents antimicrobiens immobilisés, il existe d'autres aspects des problèmes dont on doit tenir compte pour atteindre une solution
15 pratique tels que: l'identification des supports polymères qui sont appropriés par leur taille, leur forme et leurs propriétés physiques et chimiques pour permettre l'immobilisation requise, empêchant le passage à travers la peau, les plaies cutanées et les muqueuses, la résistance à la phagocytose ou la rétention au
20 point d'application; le choix de la taille et la nature des liaisons chimiques en fonction de l'agent antimicrobien et de la molécule support; et la détermination du site moléculaire sur lequel on peut fixer l'agent antimicrobien par l'intermédiaire de la liaison chimique d'immobilisation. Ce sont en pratique ces deux
25 derniers aspects qui sont très importants pour assurer la conservation de l'activité biologique de l'agent antimicrobien à l'état immobilisé.

L'invention a pour objets :

-des principes pharmaceutiques à activité antimicrobienne
30 convenant à l'administration interne par les voies gastro-intestinales ou à l'application locale, sans risques d'absorption ni de distribution ultérieure dans le système circulatoire,

-des principes pharmaceutiques à activité antimicrobienne immobilisés convenant à l'administration interne par les voies
35 gastro-intestinales ou à l'application locale, sans perte ni dilution du composé antimicrobien à partir du site d'application par passage à travers la peau, les plaies cutanées ou les muqueuses;

-des principes pharmaceutiques antimicrobiens immobilisés qui, lorsqu'on les administre par voie interne ou locale, ne
40 provoquent pas d'effets toxiques secondaires, résistent à la

phagocytose et ne provoquent pas de sensibilisation immunologique;

-un procédé pour préparer ces principes pharmaceutiques à activité antimicrobienne immobilisés; et

-l'immobilisation d'un principe pharmaceutique actif par union par covalence du principe à une molécule support polymère relativement grosse, tout en conservant l'activité pharmacologique spécifique du principe.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention ressortiront de la description qui suit.

10 L'invention concerne donc des composés ou principes antimicrobiens liés par covalence à des supports polymères, par exemple à base de polysaccharides, d'origine naturelle ou synthétique. Cette immobilisation empêche la dissolution, l'absorption et le transport des composés antimicrobiens dans ou à travers la
15 peau, les plaies cutanées et les muqueuses, ce qui limite leur action à des emplacements spécifiques et supprime les effets toxiques secondaires. La fixation par covalence de composés antimicrobiens à des supports polymères selon l'invention conduit à des composés antimicrobiens fixés qui conservent leur activité antimicrobienne et dans lesquels le couplage par liaison covalente du
20 composé antimicrobien au support polymère est stable dans tous les environnements d'emploi, y compris les environnements gastriques à faible pH.

Les composés antimicrobiens immobilisés ont de nombreuses
25 utilisations. Par exemple les antibiotiques qui sont trop rapidement absorbés par voie locale peuvent être utilisés localement après immobilisation par fixation covalente à des supports polymères. Les antibiotiques qui, par administration interne, traverseraient les muqueuses gastro-intestinales peuvent être administrés par voie orale après fixation par covalence à des supports
30 polymères pour traiter des infections de l'intestin et de l'estomac. On peut choisir la taille et la forme du support polymère pour les adapter à l'emploi particulier de l'agent antimicrobien. Dans le cas de plaies ouvertes ou de blessures, la forme du support polymère doit être telle qu'il empêche le passage dans le
35 système vasculaire du composé antimicrobien par la plaie ouverte ou la blessure. Donc pour une telle utilisation les fibres de cellulose sous forme d'un pansement constituent un bon exemple de support polymère de l'agent antimicrobien. Dans le cas d'agents antimicrobiens présents dans des savons ou des détergents,
40

il est préférable que le support polymère soit un composé soluble dans l'eau.

On peut citer comme exemples caractéristiques d'antibiotiques susceptibles d'être utilisés après immobilisation, la vancomycine et la bacitracine. Ces deux antibiotiques ont des effets indésirables graves lorsqu'ils pénètrent dans le système circulatoire. Cette pénétration peut s'effectuer lorsqu'on applique ces antibiotiques par voie locale à des plaies ouvertes. Les effets indésirables de la vancomycine peuvent être des réactions d'hypersensibilité (éruptions cutanées en macules et anaphylaxie), des frissons, de la fièvre, une toxicité vis-à-vis des oreilles et des reins et en particulier une surdité et des altérations rénales. Donc la vancomycine est actuellement peu utilisée en thérapeutique. Les effets indésirables de la bacitracine peuvent être des réactions d'hypersensibilité, des nausées, des vomissements, une diarrhée, une cylindrurie, une protéinurie, une hématurie et une altération rénale grave (oligurie et anurie).

Il est bien sûr impossible d'énumérer tous les emplois concevables des composés antimicrobiens immobilisés. De façon générale ils sont utiles pour tous les traitements de l'homme et des animaux (à l'exception de l'administration parentérale, c'est-à-dire à l'exception de l'introduction dans le système cardiovasculaire) dans le cas où le composé antimicrobien non fixé à un support serait absorbé par la peau ou les muqueuses et provoquerait des effets toxiques secondaires indésirables. D'autres avantages importants sont la meilleure rétention des composés antimicrobiens immobilisés au site d'application et leur inertie relative vis-à-vis des modifications chimiques ou enzymatiques.

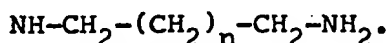
Selon l'invention on peut utiliser toutes les réactions chimiques provoquant une liaison covalente stable des composés antimicrobiens sous des formes actives du point de vue biologique et pharmaceutique à des molécules relativement grosses telles que des supports de matières solides (telles que le verre) ou polymères (telles que la cellulose) pour empêcher l'absorption de ces composés antimicrobiens à travers la peau ou les muqueuses, ainsi que leur dilution, leur perte et leur phagocytose. De façon générale on utilise par exemple des réactions de couplage avec des polysaccharides activés ou des aminotriazines; des réactions de formation d'amides, de sulfonamides, de carbonates, d'carbamates, d'iso-urée et d'autres liaisons de type iminocarbonate;

des réactions capables de former des liaisons esters, amines, sulfures ou éthers; des réactions impliquant la formation et la réduction de bases de Schiff; et des réactions impliquant des liaisons aldol, aldol déshydraté, alkyles et acyles. Dans la présente description, le terme "antimicrobien" désigne tous les types d'agents anti-infectieux, antibiotiques, antibactériens, antiviraux, antiparasitaires, antifongiques et similaires.

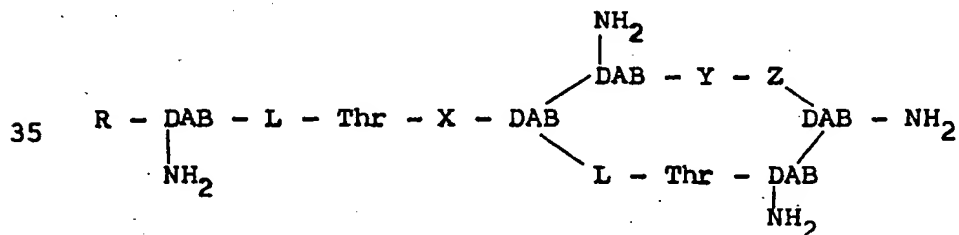
On connaît de nombreux composés antimicrobiens utiles pour lutter contre divers types d'infections de l'homme et des animaux et l'invention n'est pas limitée à un groupe ou à un composé antimicrobien particulier ni à une catégorie de poids moléculaires particulière. Comme l'invention est extrêmement utile dans le cas des agents antimicrobiens ayant des effets secondaires toxiques par application ou administration à l'homme ou aux animaux, ces composés constituent de façon logique des principes antimicrobiens utiles dans l'invention. Cependant il convient de noter que des composés antimicrobiens auxquels on ne connaît pas d'effets toxiques secondaires et pour lesquels on ne soupçonne pas la possibilité de tels effets, peuvent de façon très avantageuse être unis à une molécule support empêchant l'inactivation, la perte ou la dilution de l'agent à partir du point d'application. De plus, cette immobilisation évite une sensibilisation immunologique par emploi répété de l'agent antimicrobien. Une liste non exhaustive de tels composés figure ci-après à titre purement illustratif.

Composés antimicrobiens et antibiotiques

a. Diamines aliphatiques correspondant à la formule générale ci-dessous où n a une valeur de 2 à 18 :



b. Polymyxines B₁, B₂, D₁ et D₂ ayant la formule développée suivante:

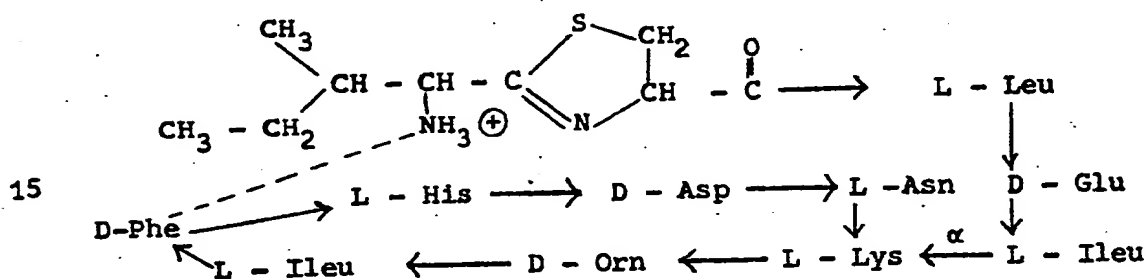


Dans cette formule, les symboles R, X, Y et Z ont les significations chimiques suivantes:

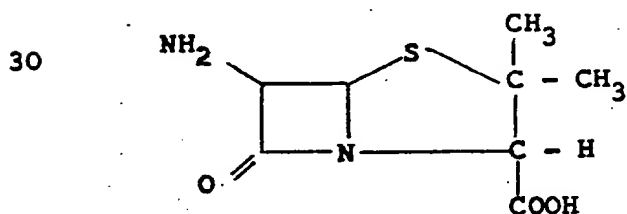
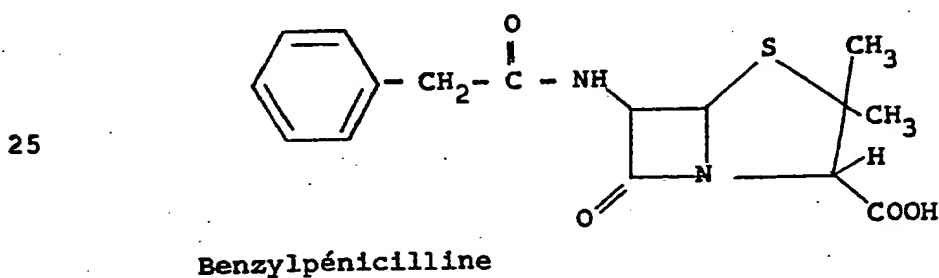
Type de polymyxine	R	X	Y	Z
B ₁	MeOct	DAB	D-Phe	L-L u
B ₂	MeHep	DAB	D-Phe	L-Leu
5 D ₁	MeOct	D-Ser	D-Leu	L-Thr
D ₂	MeHep	D-Ser	D-Leu	L-Thr

MeOct = acide méthyl-6 octanoïque; MeHep = acide méthyl-6 heptanoïque; DAB = acide L- α , γ -diaminobutyrique; Thr = thréonine; Phe = phénylalanine; Ser = sérine; Leu = Leucine.

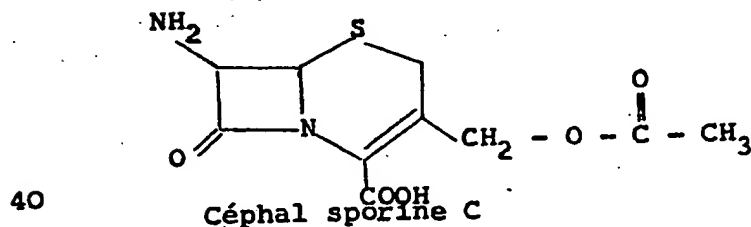
10 c. Bacitracine A ayant la formule développée suivante:



d. Pénicillines, dérivés de pénicilline et céphalosporines,
20 tels que par exemple les composés suivants:

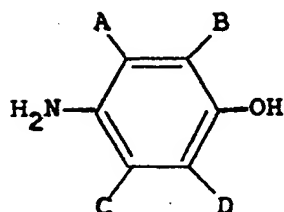


35 Acide amino-6 pénicillanique



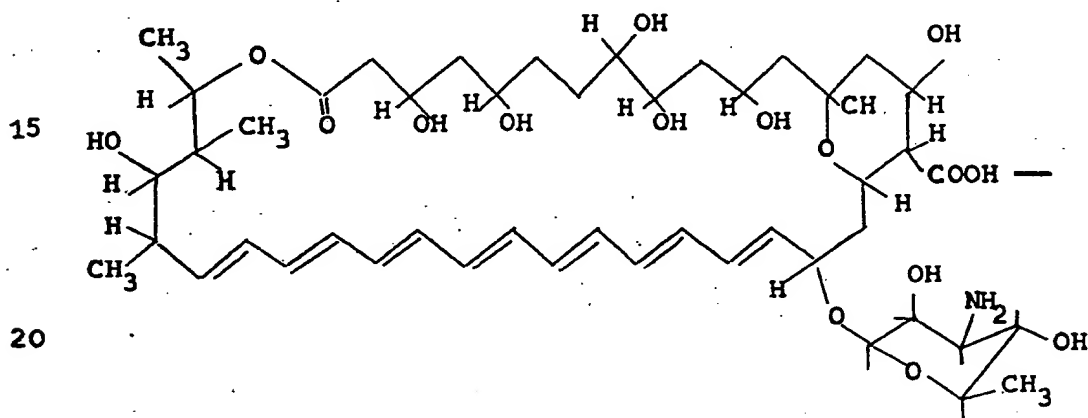
e. Aminophénols et aminophénols substitués de formule développée suivante :

5



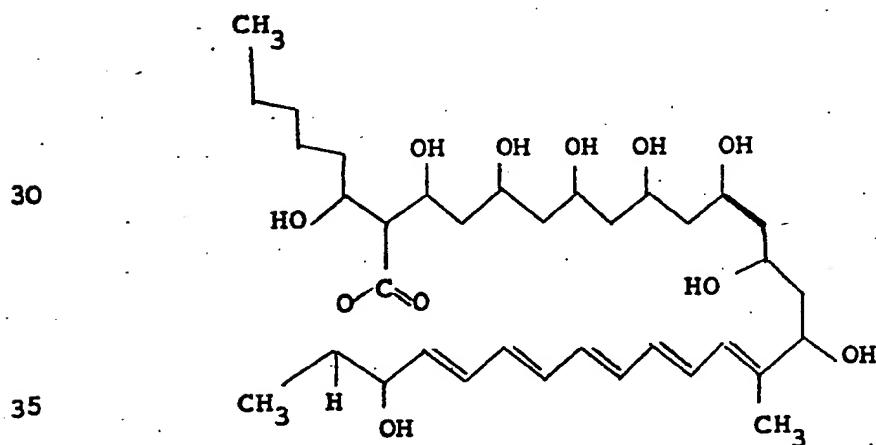
où A, B, C et D peuvent représenter par exemple H, F, Cl, Br, NO₂, NH₂, COOH et OH.

f. Antibiotiques polyéniques tels que ceux ci-dessous :



Amphotéricines

25



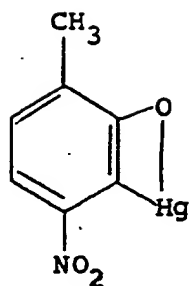
35

Filipine

g. Composés mercuriels organiques tels que les trois composés illustratifs ci-dessous :

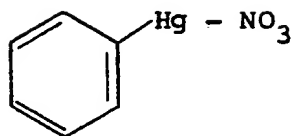
40

5



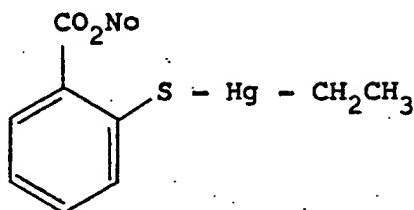
Nitromersol

10



Nitrate phénylmercurique

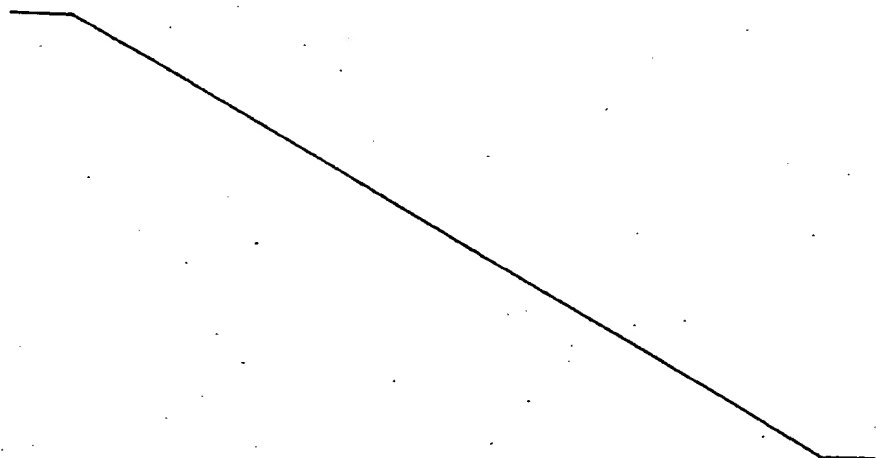
15



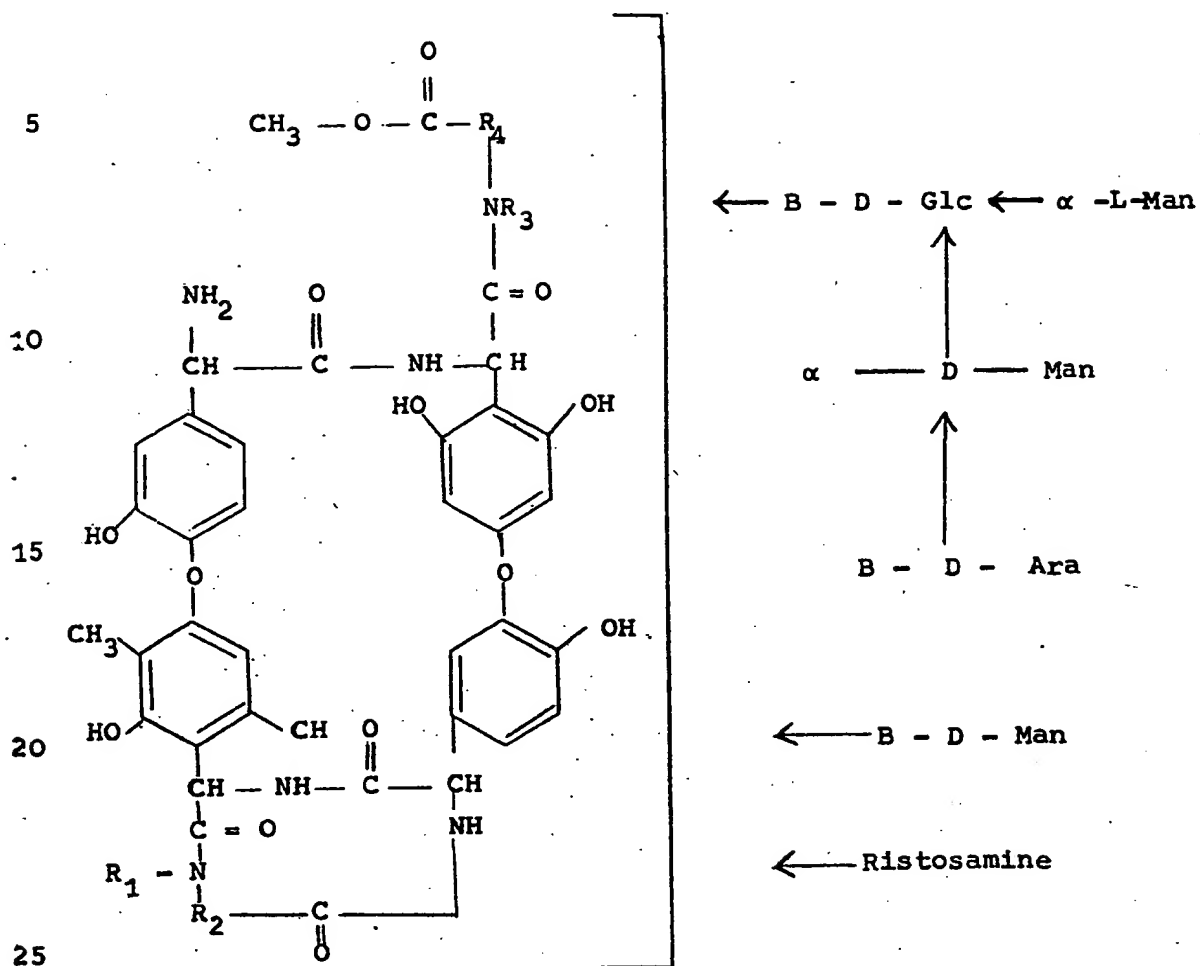
20

Thimerosal

h. Antibiotiques du groupe de la vancomycine, tels que par exemple la ristomycine A correspondant à la structure partiellement établie suivante :

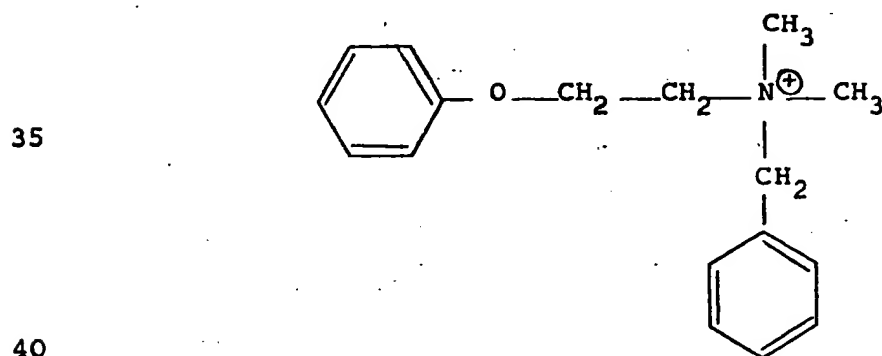


Structure partielle de la ristomycine A

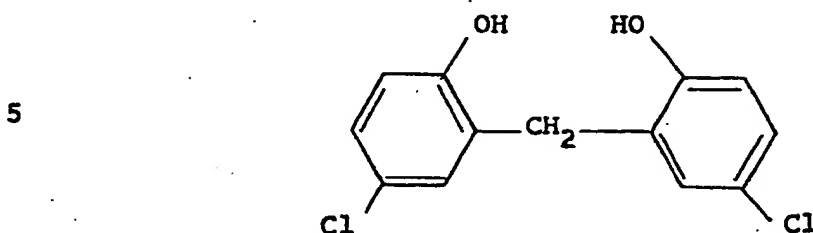


où les symboles R_1 à R_4 représentent des groupes de liaison indéterminés.

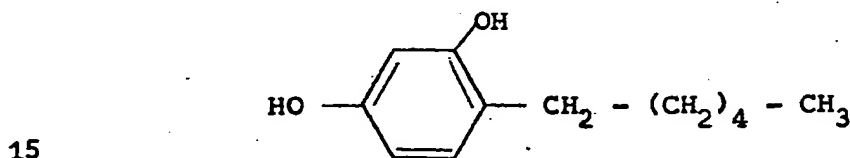
1. Béphénium correspondant à la formule développée ci-dessous :



j. Dichlorophène correspondant à la formule développée ci-dessous :



k. Hexylrésorcinol correspondant à la formule développée ci-dessous :



Les composés antimicrobiens préférés que l'on unit à des supports polymères sont les antibiotiques et plus particulièrement ceux qui exercent leur activité pharmaceutique ou antimicrobienne par action sur ou dans les parois ou membranes cellulaires. Les plus importants d'entre eux sont les polymyxines, la bacitracine et les antibiotiques polyéniques.

De même que les composés antimicrobiens, les supports polymères utiles sont trop nombreux pour pouvoir être tous cités.

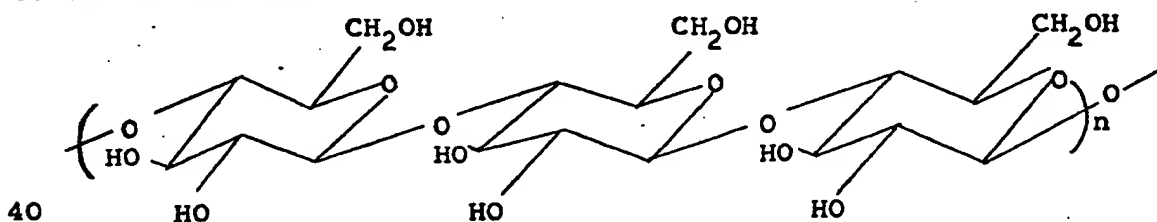
25 Cependant la liste suivante de supports appropriés choisis parmi les polysaccharides naturels et modifiés, le verre et les polymères synthétiques, illustre la grande diversité des supports possibles.

Parmi eux on préfère les polysaccharides et en particulier le dextrane et la cellulose.

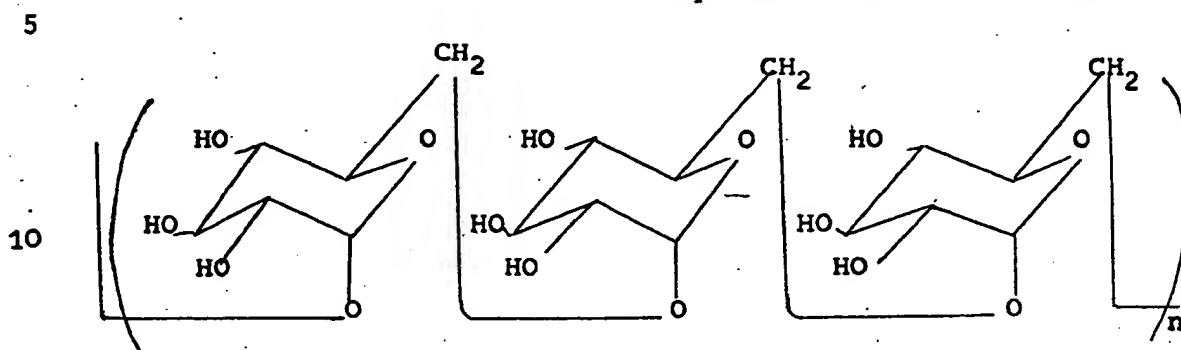
Supports solides et/ou polymères

Supports naturels.

1. Cellulose : la cellulose est un polymère linéaire de motifs de D-glucopyrannose unis par des liaisons β (1,4). Sa structure est la suivante:

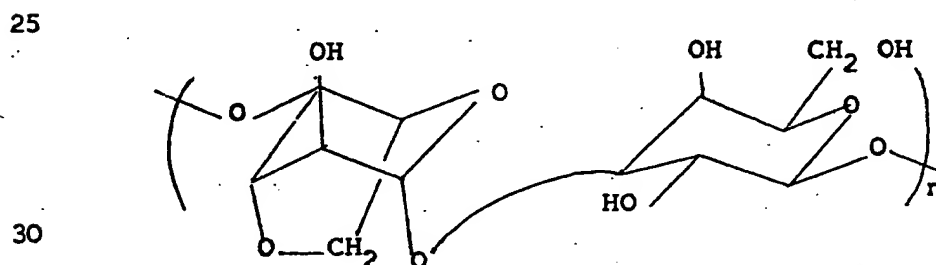


2. Dextranes: les dextranes sont des polymères ramifiés de motifs de D-glucopyrannose; le squelette comporte des liaisons α (1,6) et les ramifications correspondent à des liaisons α (1,2), α (1,3) et α (1,4). La structure du squelette est la suivante:



Les chaînes de dextrane peuvent être réticulées par de l'épichlorhydrine; des chaînes hydroxy-2 propyles s'unissent par liaisons 1,3 aux radicaux hydroxy libres des chaînes de dextrane. La Société "Pharmacia" commercialise sous le nom de Sephadex des pertes de dextranes présentant divers degrés de réticulation.

3. Agarose : l'agarose est un polysaccharide linéaire comportant des radicaux alternés de D-galactopyrannose et d'anhydro-3,6 L-galactopyrannose. Sa structure est représentée ci-après. La Société Pharmacia commercialise de l'agarose réticulé en perles sous les dénominations de Sepharose 2B, 4B, 6B et CL2B, CL4B et CL6B.



4. Amidons : par exemple l' α -amylose est un polymère non ramifié de D-glucopyrannose à liaisons α (1,4) et l'amylopectine est un polymère ramifié ayant un squelette d' α -amylose et des ramifications à liaisons α (1,6).

5. L'inuline est un copolymère complexe de motifs de D-glucopyrannose et de D-fructofurannose.

6. Les xylanes sont des polymères linéaires de motifs de D-xylopyrannose à liaisons β (1,4).

40 7. Les mannanes sont des polymères de D-mannopyrannose à

liaisons β (1,4).

8. Les glucomannanes sont des copolymères de D-glucose et de D-mannose à liaisons β (1,4).

9. Les galactanes et les arabinogalactanes sont des polymères 5 fortement ramifiés de motifs de galactose ou de motifs de galactose et d'arabinose unis respectivement par des liaisons 1,6 et 1,3.

10. Gomme arabique et autres gommes végétales

11. Collagène et autres polypeptides naturels ou synthétiques 10 et leurs dérivés.

Supports constitués de polysaccharides modifiés

1. Le traitement de polysaccharides par l'acide périodique en conditions modérées provoque la rupture de certaines des liaisons diol-1,2 pour former des fonctions dialdéhydes. On ne doit 15 pas provoquer des coupures trop importantes de la chaîne polymère. On peut utiliser les fonctions aldéhydes comme sites complémentaires de modification.

2. Les radicaux fonctionnels naturels des supports polysaccharidiques sont des radicaux hydroxy primaires et secondaires et 20 dans certains cas des radicaux acides carboxyliques (par exemple gomme arabique et xylanes). On peut citer comme autres groupes fonctionnels pouvant en dériver :

-O-CH₂CO₂H : Carboxyméthyle, par réaction avec l'hydroxyde de sodium et le chloroacétate de sodium; tel que par exemple la carbo- 25 xyméthylcellulose du commerce.

-OCH₂CH₂NH₂ : Aminoéthyle, par réaction avec l'hydroxyde de sodium et le sulfate d'aminoéthyle; tel que l'aminoéthylcellulose du commerce.

-O-SO₂R :

30 (où R représente alkyle ou aryle):

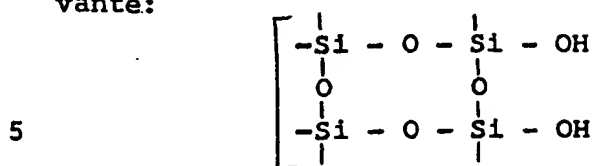
Sulfonate, par réaction avec le chlorure de sulfonyle correspondant en présence d'une amine tertiaire.

Halogéno : Halogéno, par traitement avec l'acide bromhydrique ou iodhydrique.

35 -O-CH₂-CH^R-CH₂ : Epoxy-2,3 propoxy, par réaction avec l'épichlorhydrine, en présence d'une base; des préparations de matières présentant de tels groupes fonctionnels sont commercialisées par la Société Pharmacia sous le nom de "Epoxy-activated Sepharose 6B".

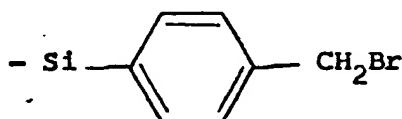
40 Verre.

On peut représenter la structure du verre de la façon suivante:

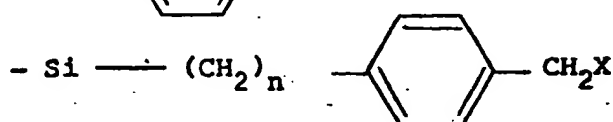


Le groupe fonctionnel naturel du verre est un radical Si-OH. On peut citer comme exemples d'autres fonctions pouvant être présentes dans le verre

10



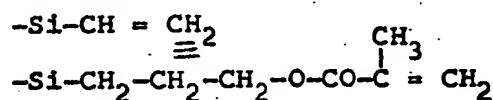
15



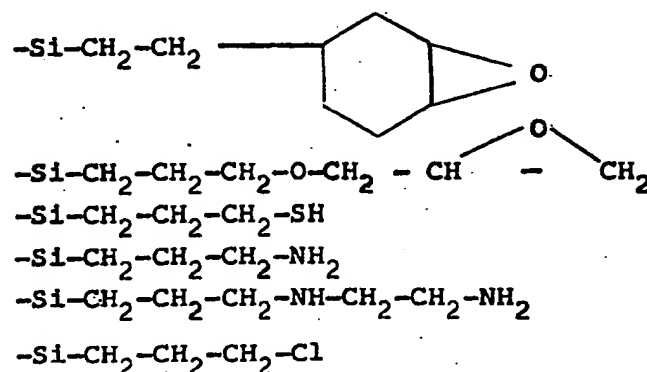
$$n = 1 - 3$$

$$X = \text{Hal.}$$

20



25

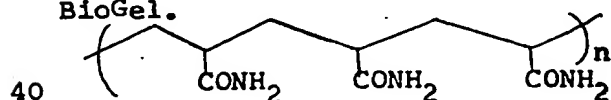


30

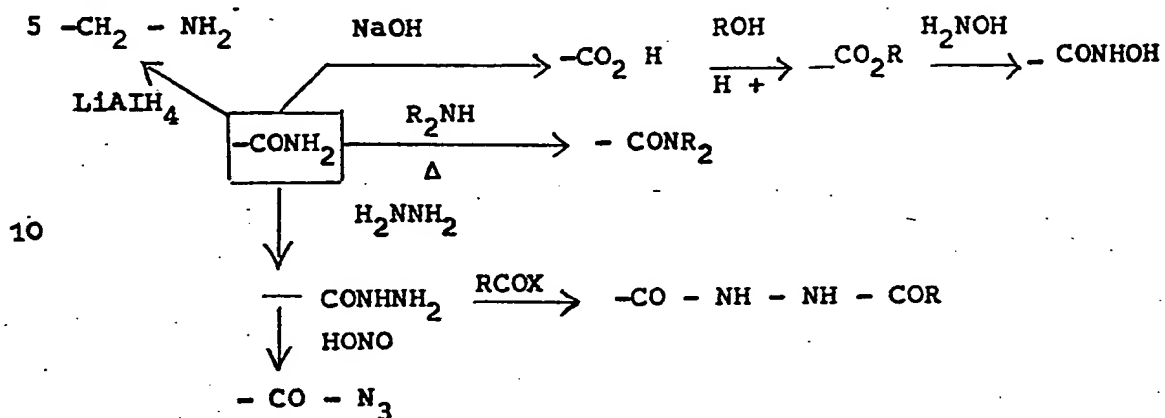
Polymères synthétiques.

1. Polyacrylamides:

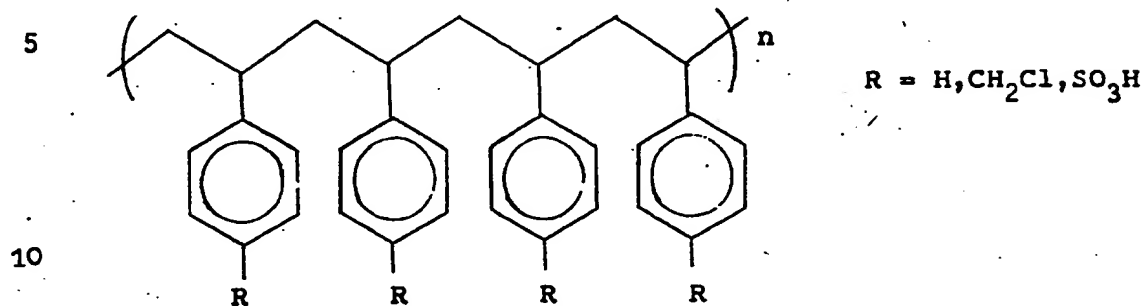
La structure des polyacrylamides est représentée ci-dessous. Cette structure est parfois réticulée avec des motifs de méthylène-bis-acrylamide ou de diacrylate de méthylène, la Société Bio-Rad Laboratories commercialise ces matières en perles avec divers degrés de réticulation, sous la dénomination de BioGel.



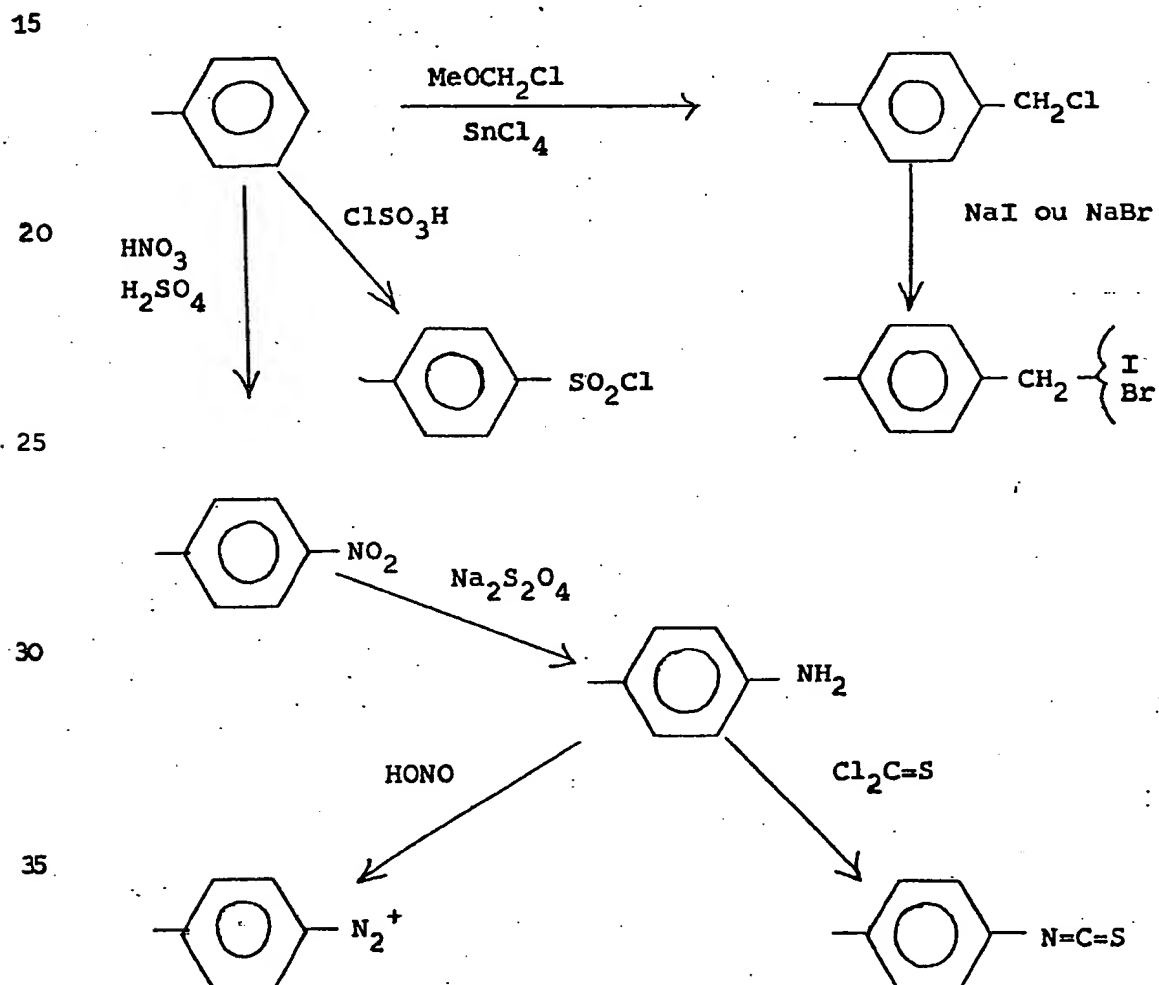
Les groupes fonctionnels des acrylamides sont des radicaux carbamoyles. On peut transformer ces radicaux en d'autres radicaux convenant à la fixation de médicaments, comme indiqué ci-dessous.



On peut se procurer dans le commerce divers polystyrènes dont certains sont sous forme de perles ayant une faible teneur en divinyl-1,1 benzène comme agent de réticulation:



Certaines réactions d'introduction de groupes fonctionnels dans le polystyrène convenant à la fixation de médicaments sont illustrés par le schéma suivant:

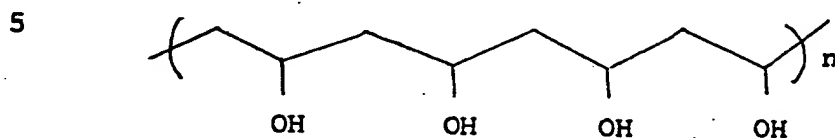


La Société Bio-Rad Laboratories commercialise des perles 40 de polystyrène réticulé et chlorométhylé sous la dénomination de

Bio-Bead S-X1 et S-X2.

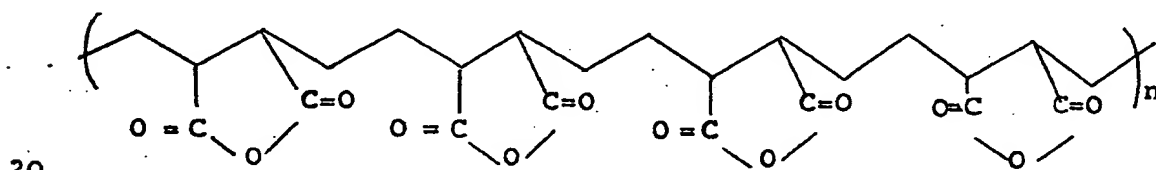
4. Alcool polyvinylique:

On prépare cette matière support par hydrolyse du poly-(acétate de vinyle). Sa structure est la suivante:



Le groupe fonctionnel naturel de cette matière est le radical hydroxy. Donc on peut le soumettre à toutes les réactions de transformation fonctionnelle décrites pour les supports polysaccharidiques, à l'exception de la transformation par l'acide périodique.

5. Copolymère de polyéthylène et d'anhydride maléique: Cette matière comporte des motifs réactifs d'anhydride succinique et on peut l'utiliser pour fixer directement des médicaments.



6. D'autres matières supports possibles sont des polymères de condensation tels que les polyesters et les polyamides (nylon) et la polyvinylpyrrolidone.

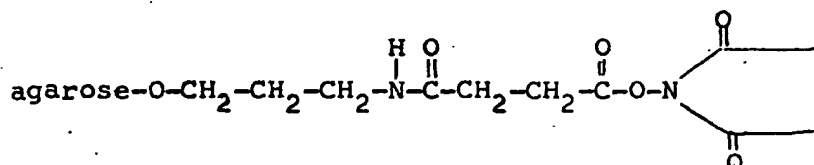
Comme la taille du support doit être suffisamment importante pour empêcher la phagocytose ou la pénétration à travers les membranes biologiques, et que le diamètre des cellules phagocytaires typiques, exprimé en microns, est le suivant : monocytes (14-20) ; macrophages (20-40); neutrophiles (12); cellules de Langhans (40-50), on estime que les molécules supports de l'invention doivent avoir un diamètre supérieur à environ 50 μ m.

On peut unir de diverses façons, comme décrit en détails ci-après, les composés antimicrobiens et les supports solides pour que les composés antimicrobiens demeurent actifs du point de vue pharmaceutique. Une des formes de liaison consiste à interposer un bras moléculaire entre le support et le composé antimicrobien pour permettre une pénétration suffisante de la cellule cible par le médicament, tandis que la molécule support limite le mouvement du médicament. A titre purement illustratif, pour montrer que les médicaments fixés peuvent conserver leur activité pharmaceutique, on fixe par covalence de la

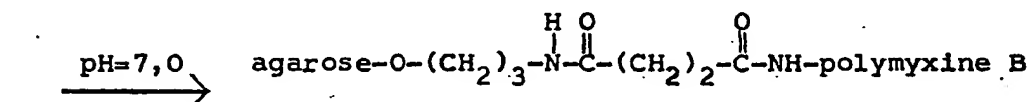
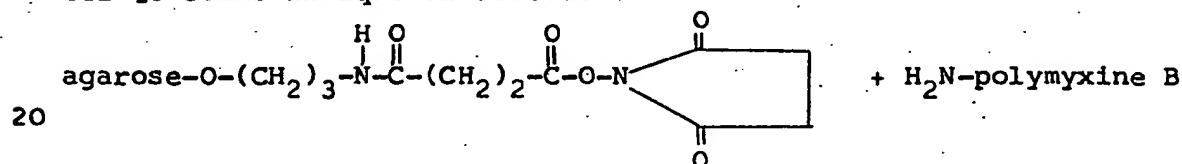
polymyxine B à des perles d'agarose activé en interposant un bras hydrocarboné de 10 Å et on met en évidence la conservation de l'activité antimicrobienne de la polymyxine B.

EXEMPLE I.-

- 5 On fixe par covalence de la polymyxine B, qui est un agent antimicrobien naturel connu, à des perles d'agarose, en faisant réagir la polymyxine B libre avec des perles d'agarose activé (commercialisées sous le nom d'Affi-Gel par la Société Bio-Rad Laboratories). La structure de l'agarose activé (Affi-Gel 10) est la suivante :



- 15 On fixe par covalence le bras latéral activé à l'agarose par une liaison éther stable. On couple la polymyxine B à l'Affi-Gel 10 comme indiqué ci-dessous :



- Les conditions de couplage sont les suivantes:
1. On dissout 2,5 g (1,8 millimole) de polymyxine B dans 25 ml de tampon phosphate 0,1 N à pH 7,0.
 2. On ajoute la solution ci-dessus à 1 g d'Affi-Gel 10 déshydraté pour obtenir 15 ml d'Affi-Gel gonflé renfermant environ 0,18 millimole de bras latéraux activés. On fait ensuite réagir ce mélange pendant 8 heures à 4°C en agitant. On lave le dérivé final avec du chlorure de sodium 1 N jusqu'à ce que l'absorbance de l'éluat à 260 nm soit nulle.

Comme on le voit, les dérivés de ce type réagissent avec les radicaux amino libres de la polymyxine pour former des liaisons amides entre les perles d'agarose et la polymyxine. La longueur du bras hydrocarboné est d'environ 10 Å et le diamètre des perles d'agarose hydraté est d'environ 74 à 149 µm. Cette taille des perles est suffisamment importante pour empêcher la phagocytose ou la pénétration à travers les membranes biologiques.

Lorsqu'il est gonflé, l'Affi-Gel 10 renferme environ 8 à 12 μ moles/ml de groupes activés. Par conséquent on utilise un excès molaire de polymyxine B décuple par rapport aux bras actifs pour empêcher qu'il se forme des liaisons amides multiples avec la polymyxine B qui comporte 4 radicaux amino libres. La modification chimique de l'un quelconque des radicaux amino ne détruit pas l'activité antibiotique, contrairement à la modification de deux radicaux amino ou plus. Par conséquent on choisit des conditions de couplage telles qu'en moyenne les molécules de polymyxine ne soient fixées aux perles d'agarose que par une liaison amide.

Après fixation par liaison covalente de la polymyxine B aux perles d'agarose, on lave à fond 1 ml de ce dérivé avec de l'éthanol et de l'eau pour éliminer toute la polymyxine libre. Le lavage consiste à utiliser successivement 200 ml d'éthanol à 10 % dans l'eau, 200 ml d'éthanol à 5 % dans l'eau et 200 ml d'eau. L'élimination efficace de la polymyxine B non fixée par cette technique de lavage, est prouvée par le fait que dans les liquides de lavage suivants on ne peut mettre en évidence de polymyxine B libre par détermination de l'activité antimicrobienne ou absorption dans l'ultraviolet. La technique de lavage peut être différente tant qu'elle élimine toutes les traces de polymyxine non couplée. Il est important que le liquide de lavage final ne renferme pas de solvant organique tel que l'éthanol résiduel, qui pourrait fausser l'interprétation des résultats.

On établit l'activité antimicrobienne de la polymyxine B fixée à des perles d'agarose de la façon suivante. On introduit un milieu de culture stérile à l'intérieur (50 ml) et à l'extérieur (100 ml) d'un sac de dialyse disposé dans un erlenmeyer. On place des perles de polymyxine-agarose à l'intérieur du sac de dialyse et on ensemence le milieu de culture intérieur et le milieu de culture extérieur avec un nombre variable d'*Escherichia coli* (ATCC n° 25922) viables compris entre 1×10^6 et 1×10^8 micro-organismes. Lorsqu'on place 0,1 mg de la polymyxine fixée à l'agarose à l'intérieur du sac de dialyse, on constate l'absence de développement bactérien à l'intérieur du sac lorsque l'inoculum est constitué de 1×10^7 micro-organismes ou moins (tableau I). De même, lorsqu'on place la polymyxine fixée à l'agarose à l'extérieur du sac, on n'observe pas de développement bactérien à l'extérieur du sac (tableau I). Des bactéries se développent toujours dans le milieu de culture extérieur lorsque les

perles de polymyxine-agarose sont à l'intérieur du sac et dans le milieu de culture intérieur lorsque les perles de polymyxine agarose sont à l'extérieur du sac. Dans les expériences témoins, on place de la polymyxine B libre (non fixée) à l'intérieur du sac de dialyse. On ne constate pas de développement bactérien à l'intérieur et à l'extérieur du sac. Dans d'autres expériences témoins, on montre que les perles d'agarose auxquelles de la polymyxine B n'est pas fixée par liaison covalente n'empêchent pas le développement bactérien.

10 Cette expérience établit les points suivants :

1. La polymyxine fixée à des perles d'agarose conserve son activité antimicrobienne.
2. La polymyxine est unie par covalence aux perles d'agarose car la polymyxine que l'on a fait réagir chimiquement avec les perles d'agarose ne traverse pas le sac de dialyse, tandis que la polymyxine libre le traverse.
3. De la polymyxine sous une forme active, pouvant traverser le tube de dialyse, n'est pas libérée des perles par réaction avec E. coli.

20

-TABLEAU I-

Effet de la polymyxine-agarose sur la croissance d'E.coli

Echantillon et description	Nombre d'E.coli. dans l'inoculum	Nombre de coliviabiles/ml après 18 h à 37°C dans le sac de dialyse	à l'extérieur du sac de dialyse
25 0,1 mg de polymyxine-agarose dans le sac de dialyse	5×10^6	0	$1,9 \times 10^9$
30 0,1 mg de polymyxine libre dans le sac de dialyse	5×10^6	0	450
35 0,1 mg de polymyxine dans le sac de dialyse	1×10^7	0	$2,1 \times 10^9$
0,1 mg de perles d'agarose dans le sac de dialyse	1×10^7	$2,1 \times 10^9$	$2,0 \times 10^9$
40 0,1 mg de polymyxine-agarose à l'extérieur du sac de dialyse	1×10^7	$2,0 \times 10^9$	0

Dans d'autres expériences on montre que la polymyxine fixée à l'agarose est active contre divers autres micro-organismes tels que : (1) *Salmonella typhimurium*, (2) *Pseudomonas aeruginosa* et (3) la levure *Candida albicans*.

5 EXEMPLE II.-

L'efficacité d'une amine primaire aliphatique, d'un acide carboxylique aliphatique et d'un aminophénol est illustrée par l'expérience suivante. On fixe par liaison covalente les composés ci-dessous à de l'agarose sous forme de l'Affi-Gel 10 utilisé
10 pour la fixation de la polymyxine B dans l'exemple I :

1. $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_{10}-\text{NH}_2$
2. $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_{10}-\text{COOH}$
3. $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_3$
- 15 4. $\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$

On étudie l'activité antimicrobienne des dérivés d'agarose de ces composés, qui sont couplés aux perles d'agarose par leurs radicaux amino, vis-à-vis de *E.coli*, *S. typhimurium*, *B.subtilis*
20 et *S. aureus*. On ajoute des inoculums à 9,5 ml d'un milieu de culture stérile. L'inoculum est constitué de 0,5 ml de germes en phase stationnaire. Dans les tubes d'expérience on ajoute 0,5 mg de l'agent antimicrobien immobilisé. Les tubes témoins renferment 0,5 mg de l'agarose non transformé ou ils ne renferment pas d'aga-
25 rose. On mélange énergiquement les échantillons, puis on prépare dix dilutions en série du tube ensemencé d'origine et on incube les cultures à 37°C pendant 12 heures.

On effectue les dilutions en série de la culture d'origine jusqu'à une dilution finale de $1 = 10^{-10}$ de l'échantillon d'ori-
30 gine. Après 12 heures, on examine les échantillons pour rechercher le développement bactérien. Le tableau II ci-après montre la dilution maximale pour laquelle on observe un développement bactérien. Les résultats conduisent aux conclusions suivantes:

1. Les perles non transformées n'ont pas d'activité antimicrobienne.
- 35 2. L'amine primaire aliphatique (N°1) est active vis-à-vis d'*E.coli*, *S.typhimurium* et *S.aureus*.
3. L'acide carboxylique aliphatique (n°2) est actif vis-à-vis d'*E.coli*.
- 40 4. L'alcane normal en C_{11} (n°3) n'a pas d'activité vis-à-vis

d'aucune des souches.

5. Le phénol (n°4) est actif vis-à-vis de *S. typhimurium* et *E. subtilis*.

Ces résultats montrent que l'amine aliphatique primaire et le phénol fixés à l'agarose présentent une activité nette vis-à-vis d'au moins un des micro-organismes à gram positif et d'au moins un des micro-organismes à gram négatif étudiés.

TABLEAU II.-

Effet des dérivés d'agarose sur des bactéries à gram positif et à gram négatif.

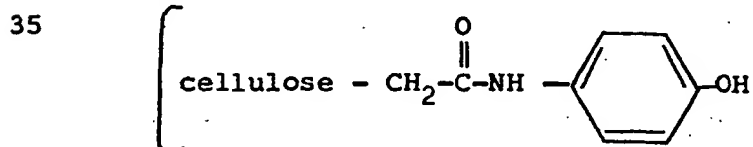
Organisme		Dilution maximale permettant la croissance								b) agarose non transformé
		n° 1		n° 2		n° 3		n° 4		
15		témoin		témoin		témoin		témoin		
		a) n°1		a) n°2		a) n°3		a) n°4		a) agarose
	<i>E.coli</i>	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶
	<i>S.typhimurium</i>	10 ⁻⁷	10 ⁻³	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
20	<i>S.aureus</i>	10 ⁻⁹	10 ⁻⁷	10 ⁻⁹	10 ⁻⁹	10 ⁻⁹	10 ⁻⁹	10 ⁻⁹	10 ⁻⁹	10 ⁻⁹
	<i>B.subtilis</i>	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸

a) Les échantillons témoins sont identiques aux échantillons expérimentaux, si ce n'est qu'ils ne renferment pas de dérivés d'agarose.

b) Les perles d'agarose non transformé sont obtenues par traitement de l'Affi-Gel avec des tampons aqueux, sans addition d'amines.

30 EXEMPLE III.-

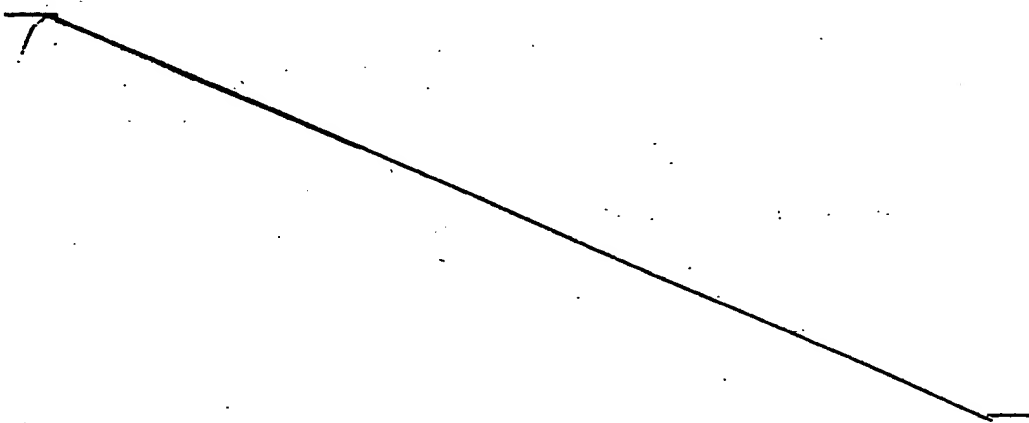
On unit par liaison covalente un aminophénol à de la cellulose en utilisant de la carboxyméthylcellulose et un réactif de type carbodiimide selon le mode opératoire indiqué ci-après, pour obtenir la structure suivante:



Phénol-cellulose I (à partir de la carboxyméthylcellulose et du p-aminophénol) :

On met en suspension 1 g de carboxyméthylcellulose (Sigma, medium, 0,7 meq/g) dans 10 ml d'eau et on ajoute 5 ml d'acide

chlorhydrique à 5 %. Après 5 minutes d'agitation, on filtre la suspension sur un entonnoir de Büchner et on lave avec 200 ml d'eau, 50 ml d'éthanol, puis 50 ml d'éther. On transfère la poudre séchée dans un erlenmeyer de 125 ml muni d'un agitateur magnétique et on ajoute 5 ml de diméthylformamide (DMF) puis 0,445g (2,15 millimoles) de dicyclohexylcarbodiimide (DCC; Aldrich) dans 7 ml de DMF et 0,545 g (5 millimoles) de p-aminophénol (Eastman) dans 5 ml de DMF. On lave les parois intérieures de l'erlenmeyer avec 3 ml additionnels de DMF et on agite la suspension doucement à la température ordinaire pendant 36 heures. A ce moment on ajoute 100 ml d'eau et on recueille le solide en suspension sur un entonnoir de Büchner et on le lave à fond avec 200 ml d'eau, 200 ml d'éthanol et 200 ml d'éther, puis on sèche à l'air pour obtenir une poudre brun clair floconneuse.

- 15 On détermine ensuite l'activité antimicrobienne vis-à-vis d'E.coli du dérivé ci-dessus et de la cellulose non modifiée en utilisant des quantités variables de phénol-cellulose et des inoculum d'importances variables. On cultive les échantillons pendant 24 heures, puis on recherche le développement des bactéries.
- 20 Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau III ci-après, où le symbole (+) indique l'existence d'une culture et le symbole (-) indique l'absence de culture. Les résultats du tableau III montrent que, contrairement à la cellulose non transformée, l'aminophénol couplé à la cellulose a une activité antibactérienne importante. On couple également l'aminophénol à l'agarose, comme décrit dans l'exemple I. Le dernier dérivé est actif vis-à-vis de S. typhimurium et B. subtilis, mais non vis-à-vis d'E. coli (tableau II). Ces résultats montrent que le choix du support polymère et du bras covalent peut avoir un effet important sur
- 30 l'activité antimicrobienne d'un composé fixé à un support.
- 

-TABLEAU III-

Effet de la phénol-cellulose I sur le développement d'E.coli.

		<u>culture</u>	
mg d'agent antimicrobien		cellulose-phénol	cellulose non modifiée
5	1 mg ^a	-	+
	2 mg ^a	-	+
	3 mg ^a	-	+
	4 mg ^a	-	+
	5 mg ^a	-	+
10	1 mg ^b	-	+
	5 mg ^b	-	+
	1 mg ^c	+	+
	0 ^a	+	+
	0 ^c	+	+

15 a) inoculum = 1×10^6 bactériesb) inoculum = 1×10^7 bactériesc) inoculum = 1×10^8 bactéries

On prépare d'autres phénol-celluloses (II à V) et leurs dérivés dichloro et diiodo comme décrit ci-dessous.

20 Phénol-cellulose II : à partir de l'aminoéthylcellulose et de l'acide (p-hydroxyphényl)-3 propionique:

On met en suspension 3 g d'aminoéthylcellulose (Sigma; environ 0,7 meq/g) dans 20 ml de diméthylformamide (DMF) et on ajoute 2,10 g (12,6 millimoles) d'acide (p-hydroxyphényl)-3-propionique (Aldrich) dissous dans le minimum de DMF, puis on ajoute 1,15 g (6,3 millimoles) de dicyclohexylcarbodiimide (DCC; Aldrich) dans 3 ml de DMF. On agite ce mélange à la température ordinaire pendant 200 heures. Après traitement avec 20 ml d'eau, on filtre la solution sur un entonnoir de Büchner et on lave à fond avec 200 ml d'éthanol. On remet le gâteau de filtration en suspension dans un bécher avec 100 ml d'éthanol, puis on filtre à nouveau sur un entonnoir de Büchner et on lave à fond avec 100 ml d'éthanol, 100 ml d'acétone et 100 ml d'éther. Après séchage à l'air, le produit est un solide d'un blanc légèrement teinté.

35 Dérivé dichloro de la phénol-cellulose II :

On met en suspension 0,7 g de phénol-cellulose II dans 5 ml d'eau et on ajoute 3 ml (3 millimoles) de solution d'hypochlorite de sodium 1N (Clorox). On agite la suspension pendant 1 heure à 0°C, durée pendant laquelle le mélange réactionnel vire du vert jaun pâle au blanc. On dilue le mélange réactionnel avec 20 ml

d'eau et on détruit l'excès d'oxydant (jusqu'à réaction négative avec un papier ioduré amidonné) en ajoutant 3 ml d'une solution aqueuse saturée de thiosulfate de sodium. On recueille le solide sur un entonnoir de Büchner et on lave à fond avec des portions
5 de 200 ml d'eau, d'éthanol à 95 %, d'acétone et d'éther, puis on sèche à l'air pour obtenir une poudre blanche.

Dérivé diiodo de la phénol-cellulose II:

On reprend le mode opératoire ci-dessus et on iode 0,7 g de phénol-cellulose II avec 2,5 ml d'une solution d'iodation
10 0,5 M (15 g d'iodure de potassium et 25 g d'iode dans 200 ml d'eau). Après traitement, lavage et séchage comme ci-dessus, on obtient une poudre brun pâle.

Phénol-cellulose III : (à partir de l'aminoéthylcellulose et de l'acide (p-hydroxyphényl)acétique:

15 On met en suspension 3 g d'aminoéthylcellulose (Sigma; environ 0,7 meq/g) dans 20 ml de diméthylformamide (DMF) et on ajoute 1,96 g (12,6 millimoles) d'acide (p-hydroxyphényl)acétique (Aldrich) dissous dans un minimum de DMF, puis on ajoute
20 dans 3 ml de DMF. On agite ce mélange à la température ordinaire pendant 48 heures. Après traitement avec 100 ml d'acétone, on recueille le solide en suspension sur un entonnoir de Büchner et on lave avec des portions de 200 ml d'éthanol, d'eau, d'acétone et d'éther, puis on sèche à l'air pour obtenir une poudre
25 floconneuse d'un blanc légèrement teinté.

Dérivé dichloro de la phényl-cellulose III:

On met en suspension 0,7 g de phénol-cellulose III dans 5 ml d'eau et on ajoute 3 ml (3 millimoles) d'une solution 1N d'hypochlorite de sodium (Clorox). On agite ensuite la suspension
30 pendant 1 heure à 0°C, durée pendant laquelle le mélange réactionnel vire lentement du jaune vert pâle au blanc. On dilue le mélange réactionnel avec 20 ml d'eau et on détruit l'excès d'oxydant (jusqu'à réaction négative au papier ioduré amidonné) en ajoutant 3 ml d'une solution aqueuse saturée de thiosulfate de
35 sodium. On recueille le solide sur un entonnoir de Büchner et on lave à fond avec des portions de 200 ml d'eau, d'éthanol à 95 %, d'acétone et d'éther, puis on sèche à l'air pour obtenir une poudre blanche.

Dérivé diiodo de la phénol-cellulose III:

40 On reprend le mode opératoire ci-dessus pour ioder 0,7 g

de phénol-cellulose avec 2,5 ml d'une solution d'iodation 0,5 M (15 g d'iodure de potassium et 25 g d'iode dans 200 ml d'eau). Après traitement, lavage et séchage comme ci-dessus, on obtient une poudre brun pâle.

5 Phénol-cellulose IV : (à partir de l'aminoéthylcellulose et de l'acide p-hydroxybenzoïque) :

On met en suspension 3 g d'aminoéthylcellulose (Sigma ; environ 0,7 meq/g) dans 20 ml de diméthylformamide (DMF) et on ajoute 1,74 g (12,6 millimoles) d'acide p-hydroxybenzoïque (Eastman) dissous dans un minimum de DMF, puis 1,15 g (6,3 millimoles) de dicyclohexylcarbodiimide (DCC; Aldrich) dans 3 ml de DMF. On agite ce mélange à la température ordinaire pendant 200 heures. Après traitement avec 100 ml d'acétone, on recueille le solide en suspension sur un entonnoir de Büchner et on lave avec 15 des portions de 200 ml d'éthanol, d'eau, d'acétone et d'éther, puis on sèche à l'air pour obtenir une poudre floconneuse d'un blanc teinté.

Dérivé diiodo de la phénol-cellulose IV :

On reprend le mode opératoire ci-dessus pour ioder 0,7 g de phénol-cellulose IV avec 2,5 ml d'une solution d'iodation 0,5 M (15 g d'iodure de potassium et 25 g d'iode dans 200 ml d'eau). Après traitement, lavage et séchage comme ci-dessus, on obtient une poudre brun pâle.

25 Phénol-cellulose V (à partir de la carboxyméthylcellulose et de la (p-hydroxy-phényl)-2 éthylamine :

On met en suspension 3 g de carboxyméthylcellulose (Sigma, Medium, 0,7 meq/g) dans 40 ml de diméthylformamide (DMF) et on ajoute 1,72 g (12,6 millimoles) de (p-hydroxyphényl)-2 éthylamine dissous dans un minimum de DMF, puis 1,15 g (6,3 millimoles) de dicyclohexylcarbodiimide (DCC; Aldrich) dans 3 ml de DMF.

On agite ce mélange à la température ordinaire pendant 48 heures, durée pendant laquelle le mélange vire au brun. Après traitement avec 100 ml d'acétone, on recueille le solide en suspension sur un entonnoir de Büchner et on lave avec des portions 35 de 200 ml d'éthanol, d'eau, d'acétone et d'éther, puis on sèche à l'air pour obtenir une poudre floconneuse d'un blanc sale.

Dérivé dichloro de la phénol-cellulose V :

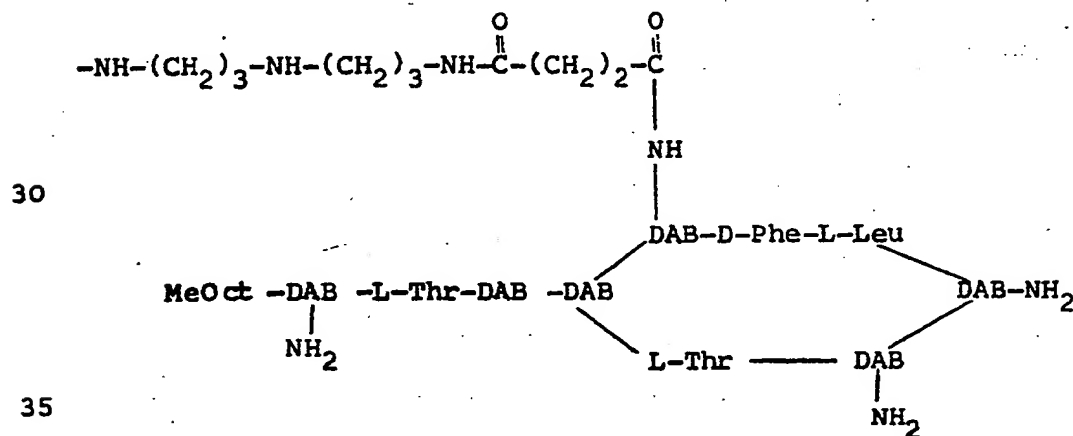
On met en suspension 0,7 g de phénol-cellulose V dans 5 ml d'eau et on ajoute 3 ml (3 millimoles) de solution d'hypochlorite 40 de sodium 1 N (clorox). On agite ensuite la suspension pendant

Dérivé diiodo de la phénol-cellulose V :

15 Il convient de noter qu'en raison du très grand nombre
de composés antimicrobiens appropriés, de supports appropriés
et de liaisons chimiques appropriées entre le composé antimicro-
bien et le support, il est impossible de citer toutes les combi-
naisons possibles. Par conséquent, les exemples suivants illus-
20 trent à titre nullement limitatif un couplage chimique de compo-
sés antimicrobiens caractéristiques à la cellulose, par l'inter-
médiaire de bras fixés par liaisons covalentes à la cellulose.

EXAMPLE IV.-

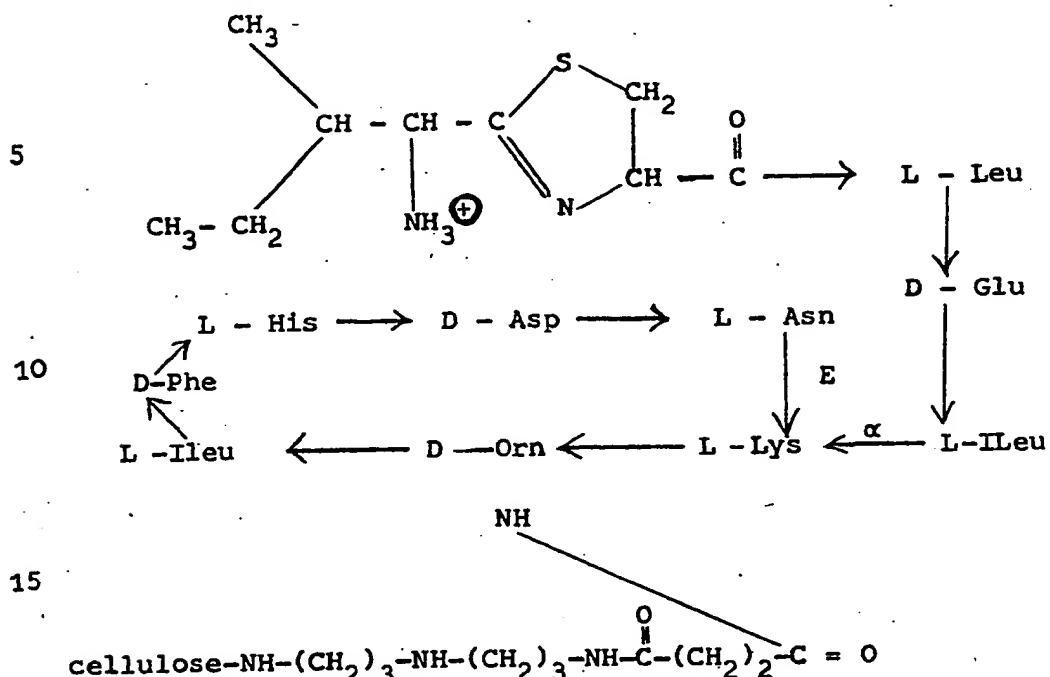
On peut coupler la polymyxine B₁ à la cellulose, comme
25 indiqué ci-dessous :



EXAMPLE V.-

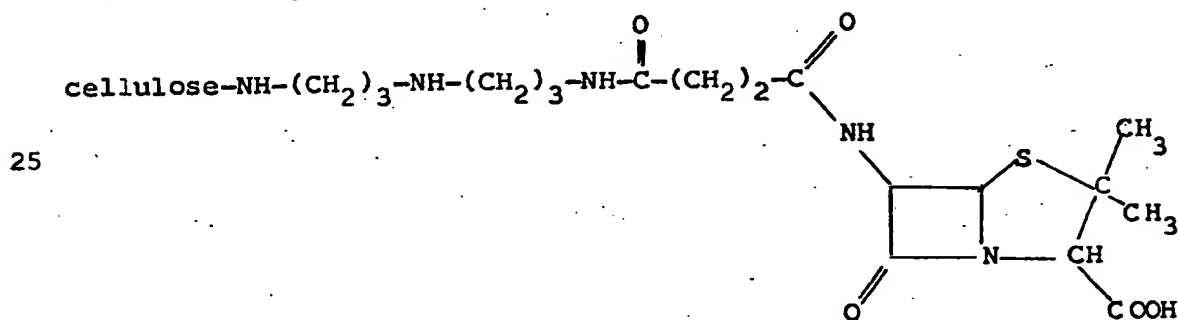
La mono-dinitrophényl-bacitracine A (dérivé formé par le radical amino de l'ornithine) conserve son activité antibiotique. Par conséquent on peut unir la bacitracine A ou ses dérivés

à la cellulose par ce radical amino de la façon suivante :



EXEMPLE VI.-

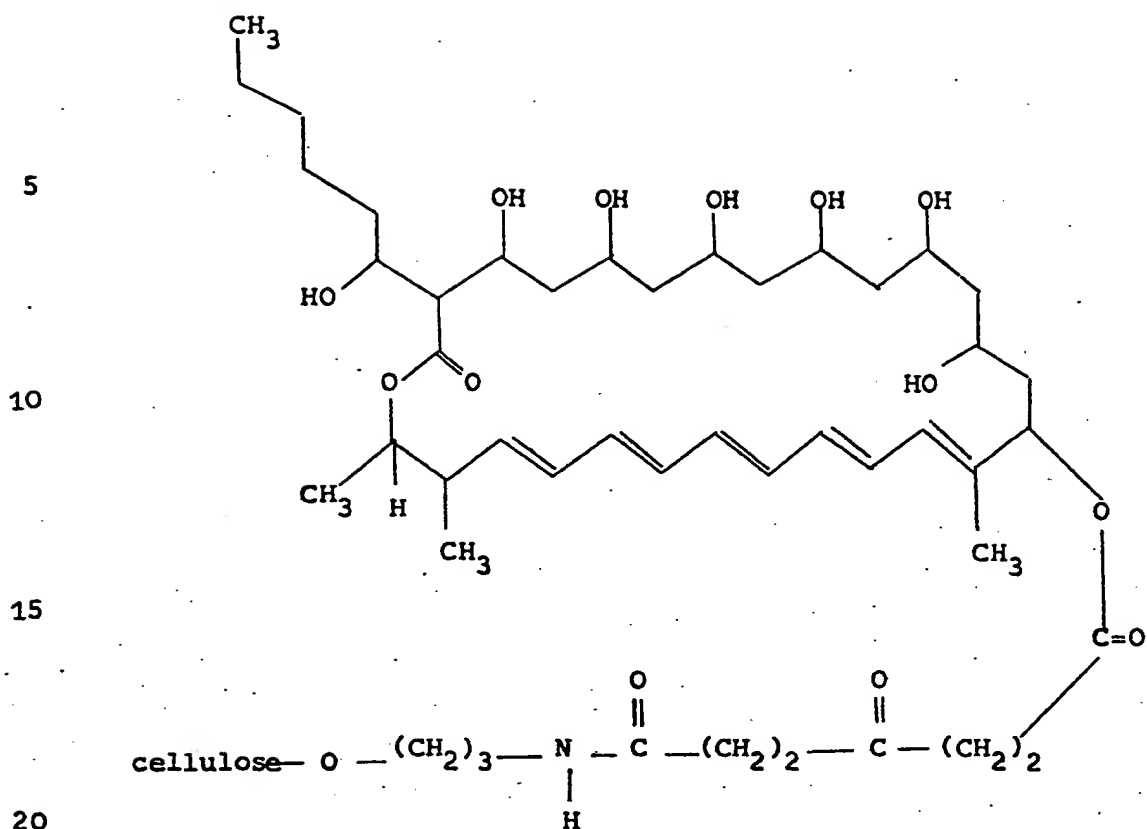
20 On peut coupler l'acide amino-6 pénicillanique à la cellulose de la façon suivante:



30

EXEMPLE VII.-

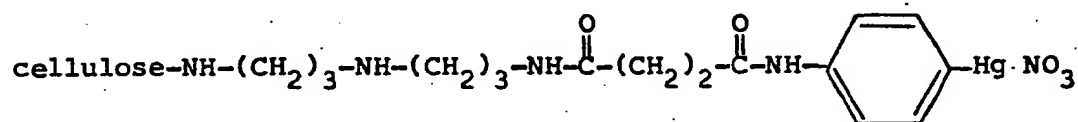
On peut fixer par liaison covalente les antibiotiques polyéniques (l'antibiotique représenté est ici la Filipine) à la cellulose par une liaison ester, comme indiqué ci-dessous :



EXEMPLE VIII.-

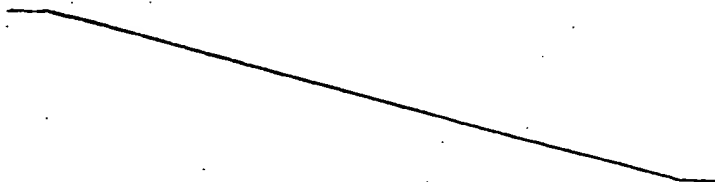
On peut fixer par liaison covalente des dérivés organiques mercuriels tels que le nitrate phénylmercurique à la cellulose comme représenté ci-dessous :

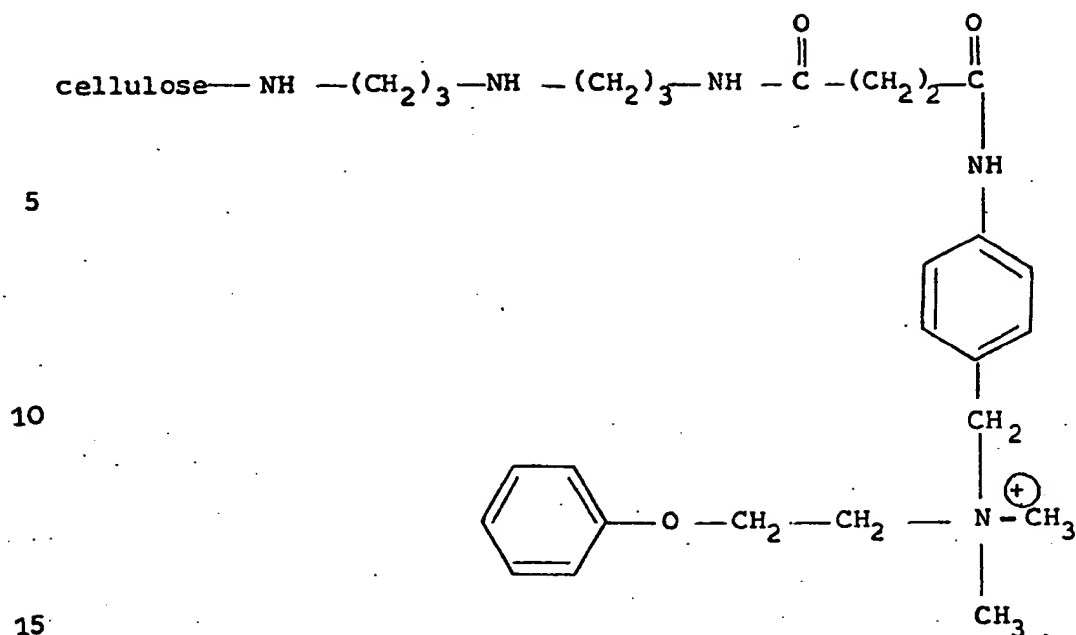
25



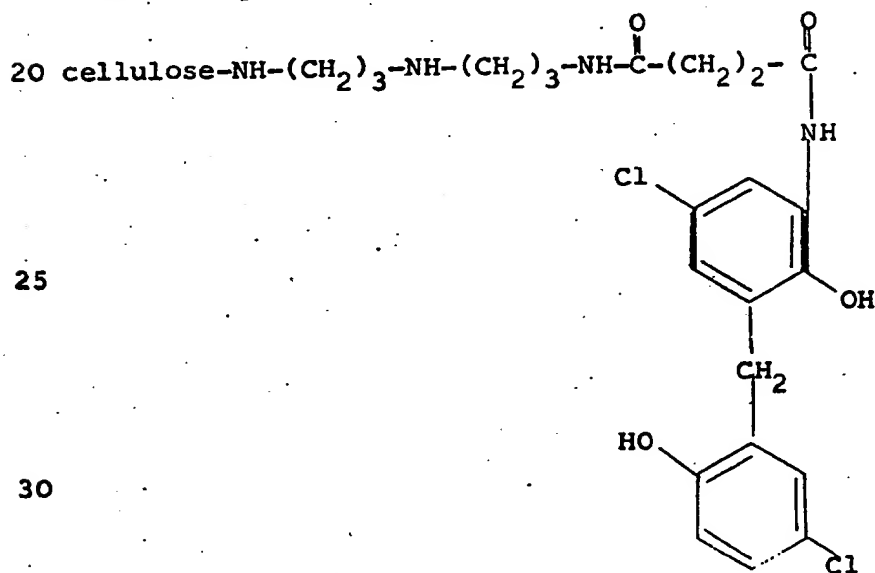
30 EXEMPLE IX.-

On peut fixer des dérivés de béphénium à la cellulose comme indiqué ci-dessous :

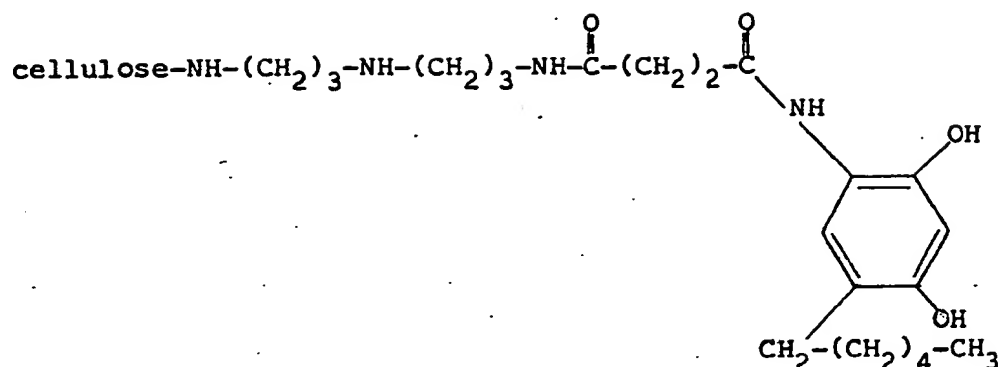


**EXEMPLE X.-**

On peut fixer des dérivés de dichlorophène à la cellulose, comme indiqué ci-dessous:

**EXEMPLE XI.-**

On peut fixer des dérivés d'hexylrésorcinol à la cellulose par des liaisons amides, comme représenté ci-dessous :



5

10 Comme précédemment indiqué, les réactions chimiques d'union des composés antimicrobiens aux supports sont nombreuses. Une description sommaire de mécanismes réactionnels illustratifs figure ci-après dans les paragraphes A à H.

A. Dérivés d'agarose activé par le bromure de cyanogène :

15 On active l'agarose par le bromure de cyanogène en traitant l'agarose avec un excès de bromure de cyanogène finement divisé à un pH très alcalin et à des températures ne dépassant pas 20°C. On effectue la formation des dérivés en faisant réagir l'agarose activé avec un agent pharmaceutique approprié, dans un tam-

23 pon ou un solvant organique approprié pendant plusieurs heures, à la température ordinaire ou à une température réduite. Ensuite on fait réagir avec des amines pour obtenir des iminocarbonates cycliques substitués à l'azote et/ou des uréthanes ou des carbamates, mais principalement l'iso-urée N-substituée. On peut éga-

25 lement utiliser dans cette réaction d'autres agents nucléophiles tels que des phénols.

Comme les dérivés monovalents d'iso-urée N-substituée des ligands ne sont pas totalement stables, on cherche à préparer des dérivés d'agarose polyvalents. Par exemple on couple de l'aga-

30 rose activé par le bromure de cyanogène à de la poly-D-lysine, de la sérum-albumine bovine ou d'autres grosses molécules renfermant des radicaux polyamino. On forme ensuite un dérivé avec le fragment d'écartement polyvalent selon des techniques classiques de façon à ce que le fragment d'écartement soit uni aux composés

35 à activité pharmaceutique par des liaisons covalentes stables (peptide, éther, etc.). L'utilisation de la poly-D-lysine comme fragment d'écartement est particulièrement appropriée, car elle résiste à la protéolyse.

B. Formation de dérivés d'agarose activé par l'acide cyanurique:

40 On a activé plusieurs supports tels que par exemple de

l'agarose pour en effectuer le couplage ultérieur par réaction avec l'amino-2 dichloro-4,s-triazine. La réaction du support activé avec des réactifs nucléophiles, tels que des amines, des thiols et des alcools, conduit à la triazine non symétrique. On effectue la formation du dérivé final dans des tampons légèrement basiques à la température ordinaire, pendant plusieurs heures.

C. Formation de liaisons amides :

On peut transformer les acides carboxyliques en réactifs d'acylation très actifs par traitement avec certains réactifs.

10 Les esters actifs obtenus peuvent correspondre à deux types : ceux formés in situ pour entrer immédiatement dans une réaction complémentaire et ceux qui sont suffisamment stables pour être isolés et caractérisés.

1. Esters actifs formés in situ. Le procédé principal de formation in situ d'agents d'acylation consiste à traiter l'acide carboxylique avec un carbodiimide approprié dont le choix est déterminé par le solvant réactionnel. De façon typique on dissout l'acide carboxylique dans un solvant approprié, dont on a ajusté le pH entre 4,5 et 6,0. On traite la solution avec le réactif de type carbodiimide pour former l'agent d'acylation actif qu'on fait ensuite réagir avec des amines primaires pour former des amides. Les durées de réaction sont comprises de façon typique entre 8 et 16 heures, à la température ordinaire. On peut également utiliser l'éthoxyacétylène comme réactif d'activation.

25 2. Esters actifs stables ou isolables :

On peut isoler les acides carboxyliques ou leurs dérivés actifs pour acyler le p-nitrophénol ou le N-hydroxysuccinide pour obtenir les esters correspondants. Ces matières constituent des agents d'acylation très actifs. Comme le procédé typique nécessite l'activation de l'acide carboxylique par un réactif de type carbodiimide, il est évident que l'utilité de ces esters actifs tient à leur stabilité élevée qui permet de les isoler et de les purifier avant couplage à un support.

3. Utilisation d'anhydrides mixtes comme réactifs d'acylation:

On peut activer les acides carboxyliques vis-à-vis de l'acylation en formant un anhydride mixte avec des dérivés d'acides carboxyliques ou d'acides carboniques appropriés. Des composés réagissants courants sont les anhydrides isovalériques et triméthylacétiques que l'on forme de façon typique dans les solvants

organiques par traitement de l'acide carboxylique avec l'halogénure d'acide approprié, en présence de la quantité théorique d'une base constituée d'une amine tertiaire. La formation de l'anhydride mixte est rapide, même à basses températures, par exemple à -5 10°C et on peut faire réagir très rapidement les dérivés avec un agent nucléophile approprié. Normalement on n'isole pas les anhydrides avant de les soumettre à la réaction ultérieure.

Le second type d'anhydrides mixtes est constitué par les anhydrides carboniques-carboxyliques parmi lesquels les carbonates d'isobutyle sont les plus courants. On peut former ces composés réagissants en faisant réagir le chloroformiate d'isobutyle et l'acide carboxylique, comme précédemment décrit. L'avantage des anhydrides mixtes carboniques-carboxyliques par rapport aux anhydrides carboxyliques mixtes, est qu'ils forment comme sous-produits des alcools très volatils et du dioxyde de carbone.

D. Formation d'esters carboxyliques :

On peut former les esters carboxyliques en acylant un alcool approprié avec une des formes activées d'un acide carboxylique précédemment décrites.

20 E. Acylation sur le carbone :

Les esters actifs décrits en 2 du paragraphe C ci-dessus concernant les esters activés stables ou isolables, sont des agents électrophiles appropriés à la réaction avec des centres carbonés nucléophiles, par exemple des énols et certains systèmes aromatiques riches en électrons. On peut considérer les trois cas décrits ci-après.

1. Enolates nucléophiles.

On peut transformer des matières renfermant des atomes d'hydrogène actif de façon réversible ou irréversible en les anions énolates correspondants, par traitement avec des agents appropriés. Dans le cas de la formation irréversible de l'énolate, on porte à reflux le composant à hydrogène actif du système avec par exemple du sodium métallique ou de l'hydruure de potassium pour obtenir les dérivés métallés. On doit choisir pour cette réaction un solvant parmi les éthers, tel que par exemple le tétrahydrofuranne ou le diglyme. Dans ces conditions, l'acylation du composé métallique s'effectue rapidement à la température ordinaire.

Sinon on peut former l'énolate de façon réversible par traitement avec des composés réagissants, tels que des alcoolates

de sodium, dans l'alcool approprié. Il convient cependant de noter que dans ce cas, le composé réagissant lui-même doit être non nucléophile, ce qui limite le choix des solvants à ceux qui présentent un fort empêchement. Dans ce procédé on porte à reflux l'alcoolate, le composé à acyler et l'agent d'acylation jusqu'à ce que la disparition de l'agent d'acylation indique que la réaction est achevée.

2. Enols nucléophiles:

On peut acyler les composés éno lisables par traitement d'un mélange de l'agent d'acylation et du composé à hydrogène actif avec un catalyseur approprié tel que par exemple le trifluorure de bore ou un étherat de trifluorure de bore, à une température voisine de 0°C. Ce procédé convient particulièrement bien à la préparation des β -dicétones.

3. Nucléophiles aromatiques :

On peut acyler les systèmes aromatiques selon des réactions catalysées par des acides de Lewis tels que par exemple le trichlorure d'aluminium, le trifluorure de bore et le chlorure stannique ou le chlorure de zinc, en conditions anhydres. Les agents d'acylation appropriés sont les anhydrides simples et les chlorures d'acides.

F. Alkylation de carbones nucléophiles :

1. Les énolates indiqués en 1 du paragraphe E ci-dessus sont des agents nucléophiles convenant au déplacement d'un anion halogène ou sulfonate d'alkyles primaires ou secondaires. De façon typique les réactions s'effectuent dans des solvants constitués d'éthers ou d'alcools, selon la base utilisée pour former l'énolate. On peut également utiliser des époxydes comme composants électrophiles, l'alkylation produisant l'alcool secondaire ou tertiaire. Lorsqu'on utilise comme composants électrophiles des aldéhydes ou des cétones, les produits réactionnels peuvent être des composés carbonylés de type β -hydroxy ou α,β -insaturé (condensation aldolique).

2. L'alkylation des composés nucléophiles aromatiques (alkylation de Friedel et Crafts) s'effectue par réaction d'halogénures et de sulfonates d'alkyles et de composés aromatiques, en présence de catalyseurs qui sont des acides de Lewis, généralement le trichlorure d'aluminium. On utilise des systèmes aromatiques réactifs pour atténuer les conditions réactionnelles qui sont souvent énergiques.

Une réaction apparentée est l'hydroxyalkylation des aldéhydes et des cétones. Cette réaction avec des phénols est particulièrement utile pour former le méthylène biphénylé dans la réaction avec les aldéhydes dans des milieux alcalins.

5 G. Alkylation d'oxygènes nucléophiles :

La réaction d'alcoolates d'alkyle ou d'aryle avec des composés électrophiles appropriés forme des éthers avec un bon rendement. Les substrats de la réaction sont des halogénures, sulfonates, sulfates et époxydes d'alkyle. La réaction donne les
10 meilleurs rendements et le moins de réactions secondaires lorsque l'alkylation comporte le déplacement des centres carbonés primaires d'alcoolates d'alcools primaires ou secondaires. En conditions énergiques, les alcools réagissent avec les sels d'aryl-diazonium pour former des éthers aryliques.

15 H. Alkylation d'amines :

1. On peut faire réagir les amines avec des halogénures, sulfates ou sulfonates d'alkyle pour obtenir les amines alkylées. La régulation de la réaction est difficile et il s'effectue souvent une addition de plusieurs radicaux alkyles à l'azote; ce
20 procédé est donc particulièrement utile pour préparer les amines tertiaires.

La réaction générale consiste à faire réagir les amines avec des époxydes pour obtenir un amino-alcool, mais elle est particulièrement satisfaisante avec les époxydes comportant un
25 centre réactionnel primaire. En conditions énergiques, les amines réagissent avec les sels d'aryl-diazonium pour former des arylamines.

2. Alkylation réductrice. Les amines primaires réagissent avec les aldéhydes et les cétones en solution alcoolique pour
30 former une base de Schiff (imine). On peut réduire ces intermédiaires sans isolement en utilisant de nombreux composés réagissants tels que le borohydrure de sodium, l'acide formique et le zinc dans l'acide chlorhydrique, ou par réduction catalytique avec du nickel de Raney.

35 Il convient de noter que l'alkylation réductrice d'autres fonctions azotées est possible si les radicaux fonctionnels sont par exemple des radicaux nitro, nitroso ou azo susceptibles d'être réduits par les composés réagissants précités.

3. Formation des bases de Mannich. Les amines aliphatiques
40 réagissent avec les composés renfermant des hydrogènes actifs, y


compris les aldéhydes, les cétones, les acides et esters carboxyliques, les nitriles, les composés de type nitro et certains phénols et composés benzyliques, en présence de formaldéhyde ou d'autres aldéhydes de bas poids moléculaire, pour former des bases de Mannich, c'est-à-dire des composés dont l'hydrogène actif a été aminométhylé. La réaction s'effectue généralement à reflux en solution aqueuse ou alcoolique et on peut la catalyser avec un acide ou une base.

I. Alkylation de soufre nucléophile :

10 Les thiols et les thiolates alcalins réagissent bien avec les halogénures d'alkyle, les sulfonates, les sels d'aryl-diazonium et les époxydes pour former les sulfures (thioéthers). Les conditions de la réaction sont très semblables à celles de la formation des éthers (voir le paragraphe G précédent) ou des amines (voir le paragraphe H précédent) à partir de ces composés électrophiles.

La liaison covalente entre le support et le composé médicamenteux se forme par réaction du groupe fonctionnel du composant 1 (composant activé; électrophile) et du groupe fonctionnel du composant 2 (nucléophile). L'agent médicamenteux et le support peuvent constituer l'un ou l'autre des composants. Dans tous les cas les groupes fonctionnels caractéristiques des deux composants impliqués dans la formation de la liaison et la liaison finale figurent dans le tableau IV. De façon générale on préfère les liaisons amides, éthers et amines pour des raisons de stabilité dans les divers environnements opératoires.

Dans certains cas, comme précédemment indiqué, il peut être préférable d'interposer un bras moléculaire entre la matière support et l'agent médicamenteux. Ce bras peut être constitué du composant 1 ou du composant 2. Donc, après la réaction, le bras est fixé entre le support et la matière à activité biologique. Les bras, dont des exemples figurent ci-après, peuvent être introduits selon des réactions semblables à celles utilisées pour unir le support et l'agent médicamenteux :



- a. $-\left[-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-(\text{CH}_2)_n-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}(\text{CH}_2)_m-\right]_o$
- b. $-\left[-\text{NH}-(\text{CH}_2)_n\right]_m$
- 5 c. $-\left[-\overset{\text{OH}}{\underset{|}{\text{CH}}}-(\text{CH}_2)_n\right]_m$
- d. $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n$
- 10 e. $-\left[-\text{NH}-\underset{\text{R}}{\underset{|}{\text{CH}}}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\right]_m$

où m, n et o ont une valeur d'au moins un.

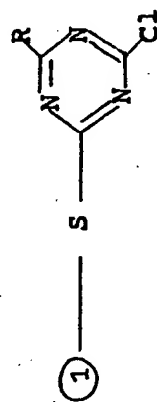
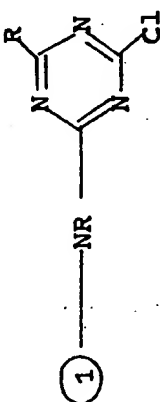
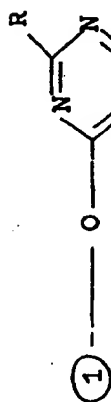
-TABLEAU IV-

composant 1		composant 2
15 composant activé	structure et nom de la liaison	
électrophile		nucléophile
activés par le bromure de cyanogène		
20	$\textcircled{1} - \text{O} - \overset{\text{O}}{\parallel}\text{C} - \underset{\text{R}}{\text{N}} - \textcircled{2}$ uréthane ou carbamate	$\text{HN} - \textcircled{2}$ R
	$\textcircled{1} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \diagdown \\ \diagdown \text{O} \diagup \end{array} \text{C} = \text{N} - \textcircled{2}$ N-iminocarbonate	$\text{HN} - \textcircled{2}$ R
25	$\textcircled{1} - \text{O} - \overset{\text{N-H}}{\parallel}\text{C} - \underset{\text{R}}{\text{N}} - \textcircled{2}$ iso-urée	$\text{HN} - \textcircled{2}$ R
30	$\textcircled{1} - \text{O} - \text{C} \equiv \text{N}$ et $\textcircled{1} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \diagdown \\ \diagdown \text{O} \diagup \end{array} \text{C} = \text{NH}$	
	$\textcircled{1} - \text{O} - \overset{\text{O}}{\parallel}\text{C} - \text{O} - \textcircled{2}$ carbonate	$\text{HO} - \textcircled{2}$
35	$\textcircled{1} - \text{O} - \overset{\text{NH}}{\parallel}\text{C} - \text{O} - \textcircled{2}$ Iminocarbonate	$\text{HO} - \textcircled{2}$

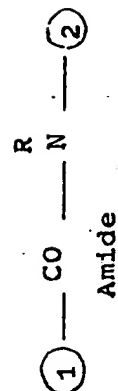
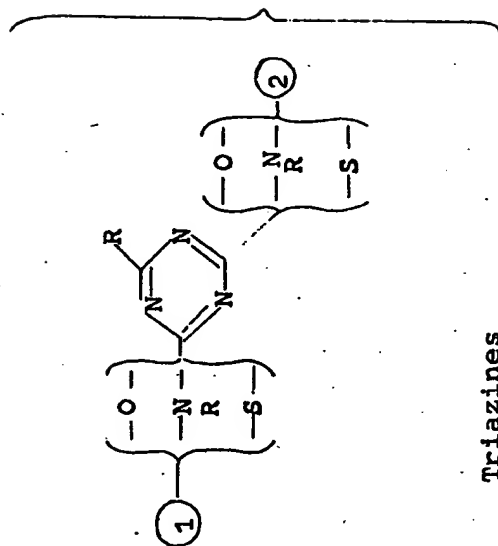
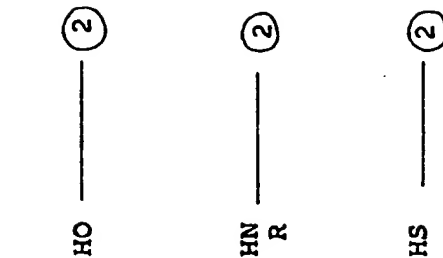
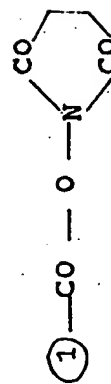
-TABLEAU IV- (suite)

composant 1		composant 2
composant activé	structure et nom de la liaison	
électrophile		nucléophile

supports activés par l'acide cyanurique



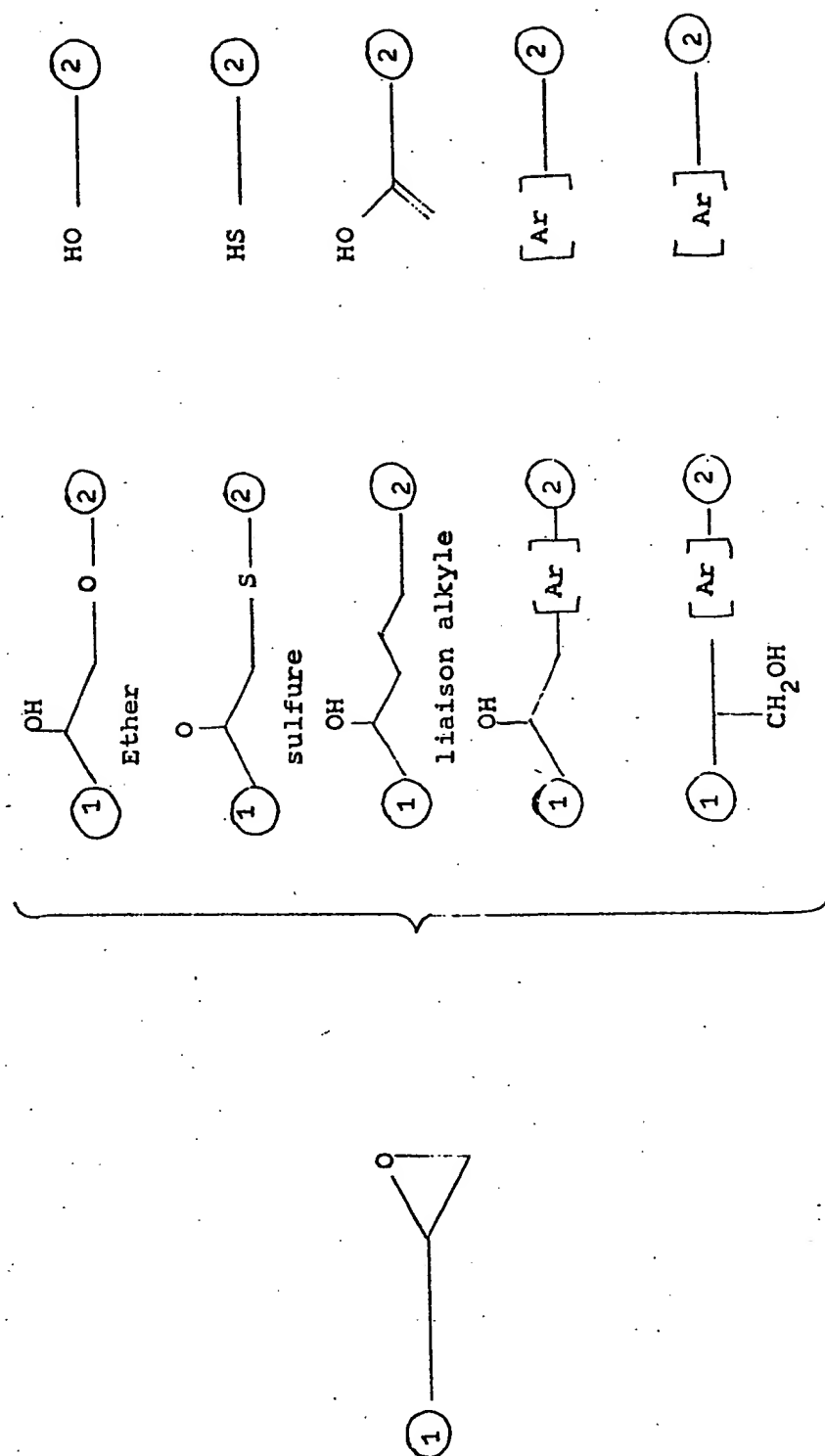
esters actifs/anhydrides



-TABLEAU IV-(suite)

composant 2
nucléophile

structure et nom de la liaison

composant 1
composant activé
électrophile

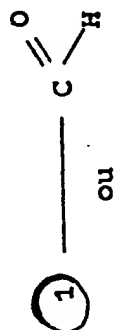
composant 1
composant activé électrophile

TABLEAU IV- (suite)

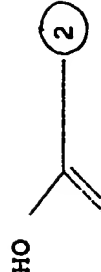
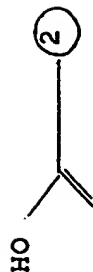
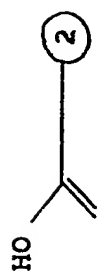
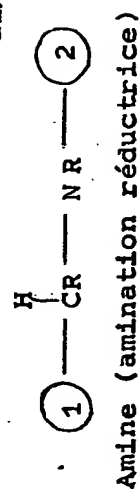
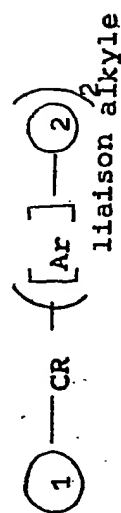
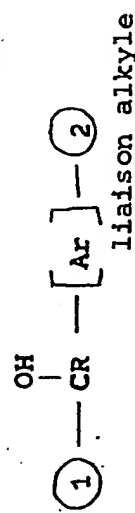
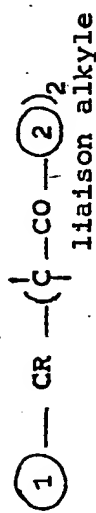
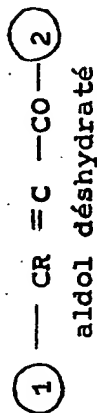
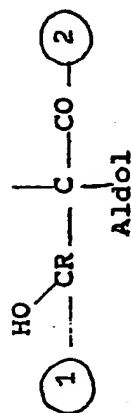
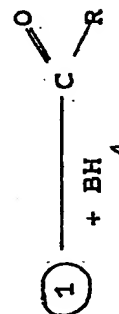
structure et nom de la liaison

composant 2
nucléophile

aldéhyde/cétone



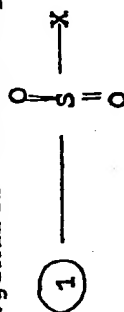
ou



-TABLEAU IV- (suite)

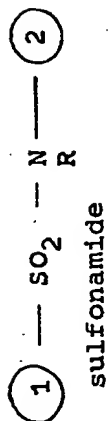
composant 1	composant 2
composant activé électrophile	nucléophile

halogénures de sulfonyle

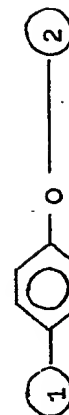
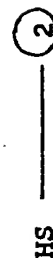
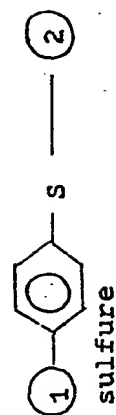
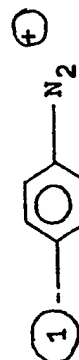


où

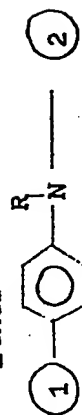
X = Cl, Br



sel de diazonium



Ether



Bien entendu l'invention est susceptible de diverses variantes sans sortir de son cadre.

-REVENDICATIONS-

- 1.- Composition médicinale à activité pharmaceutique, caracté-
risée en ce qu'elle est constituée d'un principe antimicrobien à
activité pharmaceutique uni par liaison covalente aux molécules
5 d'un support, ces molécules de support ayant des dimensions suf-
fisamment importantes pour empêcher leur passage à travers la
peau et les muqueuses ou leur pénétration par les plaies cutanées.
- 2.- Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce
que le principe antimicrobien actif est choisi parmi les composés
10 antimicrobiens ayant des molécules suffisamment petites pour per-
mettre leur passage à travers la peau, les muqueuses ou les plaies
cutanées et qui provoquent des effets toxiques secondaires lors-
qu'ils pénètrent dans le système circulatoire.
- 3.- Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce
15 que le principe antimicrobien actif est choisi parmi les diamines
aliphatiques, les polymyxines, la bacitracine, les pénicillines,
les dérivés de pénicilline, les céphalosporines, les aminophénols,
les phénols substitués, les antibiotiques polyéniques, les compo-
sés mercuriels organiques, les antibiotiques de type vancomy-
20 cine, le béphénium, le dichlorophène et l'hexylrésorcinol.
- 4.- Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce
que le principe antimicrobien est choisi parmi les polymyxines,
la bacitracine et les antibiotiques polyéniques.
- 5.- Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce
25 que les molécules supports sont choisies parmi les polysaccharides
naturels, les polysaccharides modifiés, les polypeptides naturels,
les polypeptides synthétiques, le verre, le verre comportant des
groupes fonctionnels actifs et des polymères synthétiques.
- 6.- Composition selon la revendication 5, caractérisée en ce
30 que les molécules supports sont des polymères choisis parmi les
polyacrylamides, les polyacrylates, les polystyrènes comportant
des groupes fonctionnels, l'alcool polyvinylique, les copolymères
de polyéthylène et d'anhydride maléique, la polyvinylpyrrolidone
et les polymères de condensation tels que les polyesters et les
35 polyamides.
- 7.- Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce
que la liaison covalente est choisie parmi les liaisons amide,
carbonate, carbamate, iminocarbonate, iso-urée, triazine, acyle,
alkyle, base de Mannich, sulfure, sulfonamide, ester, amine et
40 éther.

8.- Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comporte un bras moléculaire entre le principe antimicrobien actif et le support, ce bras moléculaire étant choisi parmi ceux indiqués en (a) à (e) ci-après et leurs combinaisons:

- 5
- a. $-\left[-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-(\text{CH}_2)_n-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}(\text{CH}_2)_m-\right]_o$
- b. $-\left[-\text{NH}-(\text{CH}_2)_n-\right]_m$
- 10 c. $-\left[-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH}-(\text{CH}_2)_n-\right]_m$
- d. $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n$
- c. $-\left[-\text{NH}-\underset{\text{R}}{\underset{|}{\text{CH}}}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\right]_m$
- 15

où n, m et o sont égaux au moins à un.

9.- Procédé pour préparer une composition médicinale à activité pharmaceutique ne pouvant pas traverser la peau, les muqueuses ou les plaies cutanées pour pénétrer dans le système circula-

20 toire, caractérisé en ce qu'il consiste à faire réagir un principe antimicrobien à activité pharmaceutique avec une matière support ayant des molécules suffisamment grosses pour empêcher leur passage à travers la peau, les muqueuses ou les plaies cutanées, pour former entre elles une liaison covalente stable dans tous

25 les environnements correspondant à l'emploi prévu.

10.- Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que le principe antimicrobien actif est choisi parmi les polysaccharides naturels, les polysaccharides modifiés, les polypeptides naturels, les polypeptides synthétiques, le verre, les verres

30 comportant des groupes fonctionnels, les polymères synthétiques et en ce que les molécules supports sont choisies parmi la cellulose, les dextranes, l'agarose, l'amidon, l'inuline, les xy-lanes, les mannanes, les glucomannanes, les galactanes, les arabinogalactanes, la gomme arabique, les gommes végétales et

35 leurs dérivés et leurs formes modifiées par oxydation par le périodate.

11.- Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que la liaison covalente formée par cette réaction consiste en une liaison amide, carbonate, carbamate, iminocarbonate, iso-urée,

40 triazine, acyle, alkyle, base de Mannich, sulfure, sulfonamide,

ester, amine et éther et en ce que le principe antimicrobien actif est choisi parmi les composés antimicrobiens ayant des molécules suffisamment petites pour permettre leur passage à travers la peau, les muqueuses et les plaies cutanées et provo-
5 quant des effets toxiques secondaires lorsqu'ils pénètrent dans la circulation générale.